

Quelques effets du 3-amino-1,2,4-triazol sur le métabolisme des feuilles de l'*Oryza sativa* L*

Suong PHUNG-NHU-HUNG

Laboratoire de Physiologie végétale, associé au C.N.R.S., Faculté des Sciences,
Orsay (Essonne)

et Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (Essonne)

(Manuscrit reçu le 7 février 1967)

Paris

RÉSUMÉ



Les conditions dans lesquelles le 3-amino-1,2,4-triazol (AT) agit sur le métabolisme photosynthétique et respiratoire sont étudiées.

Des plantes (*Oryza sativa* L., variété Balilla) sont traitées par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M. Les feuilles formées ultérieurement sont sans chlorophylle. La synthèse des caroténoïdes est moins réduite et il apparaît un pigment nouveau du groupe du lycopène. Ces feuilles sont également appauvries en glucides réducteurs, en saccharose et en protéines.

L'émission photosynthétique d'O₂ est très faible. Les chloroplastes isolés des feuilles traitées ont perdu leur activité ribulose-diphosphate carboxylase. Leur réaction de HILL en présence de K₃Fe(CN)₆ et leur photophosphorylation cyclique en présence de phénazine méthosulfate sont très amoindries.

In vitro, l'AT n'exerce pas d'inhibition sur les réactions des chloroplastes de témoins non préalablement traités.

L'absorption respiratoire d'O₂ des feuilles blanchies est exaltée ainsi que les activités glucose-6-phosphate et 6-phosphogluconate déshydrogénases. L'incorporation du ³²P dans l'acide phosphoglycérique est faible, mais le marquage des oses-phosphates est intense. Ces faits suggèrent une inhibition de l'aldolase et une augmentation d'activité de la voie d'oxydation passant par les pentoses-phosphates.

In vitro, l'AT est sans action sur la phosphorylation oxydative des mitochondries extraites de Concombres non traités, à l'inverse du 2,4-dinitrophénol. Par contre, l'action découplante se manifeste après prétraitement des plantes par l'AT à $2 \cdot 10^{-3}$ M et $2 \cdot 10^{-2}$ M.

L'ensemble des résultats suggère bien et précise l'action différentielle de l'AT sur la genèse des protéines-enzymes responsables des différents mécanismes fonctionnels.

* Cet article couvre le travail d'une Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles, 1967, présentée à la Faculté des Sciences d'Orsay le 20 avril 1967. Il est enregistré au Centre National de la Recherche Scientifique sous le n° AO 1337.

SUMMARY

The modalities of the action of 3-amino-1,2,4-triazol (AT) on the photosynthetic and respiratory metabolisms are studied.

Plants (Oryza sativa L., variety Balilla) are treated with $1,2 \cdot 10^{-5}$ M AT. Leaves formed after treatment are chlorophyll-less. Carotenoid synthesis is less affected and a new lycopene-like pigment is formed. Treated leaves contain also less reducing carbohydrates, saccharides and proteins.

Photosynthetic O_2 evolution is low. Chloroplasts isolated from treated leaves have lost ribulose-diphosphate carboxylase activity. Their Hill reaction with $K_3Fe(CN)_6$ and their cyclic photophosphorylation with phenazine methosulfate are much reduced.

There is no in vitro inhibitory effect of AT on chloroplasts extracted from the non-treated plants.

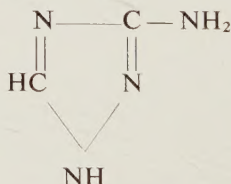
The respiratory O_2 uptake of the bleached leaves is enhanced as well as glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate deshydrogenase activities. The incorporation of ^{32}P in phosphoglyceric acid is low, but the sugar-phosphates are heavily labelled. These facts are suggestive of an inhibition of aldolase and of a higher activity of the oxidative pentose pathway.

Unlike 2,4-dinitrophenol, AT has no effect on the in vitro oxidative phosphorylation of mitochondria extracted from Cucumber. However, the uncoupling effect is apparent after treatment of the plants with $2 \cdot 10^{-3}$ M and $2 \cdot 10^{-2}$ M AT.

The data as a whole point out to a specific effect of AT on the genesis of the protein-enzymes responsible for the various functional activities.

INTRODUCTION

Le 3-amino-1,2,4-triazol (AT) est un composé azoté hétérocyclique, très soluble dans l'eau. Sa formule chimique est la suivante :



Abréviations :

AT	: 3-amino-1,2,4-triazol
TCA	: acide trichloracétique
PGA	: acide phosphoglycérique
DPIP	: dichlorophénol indophénol
Chl	: chlorophylle
PMS	: phénazine méthosulfate
FMN	: flavine mononucléotide
NADP	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ATP	: adénosine-triphosphate
ADP	: adénosine-diphosphate
RuDP	: ribulose-diphosphate
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
G-6-P	: glucose-6-phosphate
6-PG	: 6-phosphogluconate
DNP	: 2,4-dinitrophénol
PEP	: acide phosphoénolpyruvique

Il a tout d'abord été utilisé par HALL et ses collaborateurs, à partir de 1952, à la Station d'Agriculture Expérimentale du Texas, en tant qu'agent de défoliation très efficace des plants de Coton. Puis il fut connu pour ses propriétés herbicides et ses effets inhibiteurs sur la croissance et la chlorophyllogénèse de nombreuses plantes supérieures (HALL, JOHNSON et LEINWEBER, 1954 ; PASTAC, 1959).

L'AT pénètre facilement dans les plantes par absorption racinaire ou par application foliaire. Sa migration est rapide et préférentielle vers les méristèmes terminaux des racines et des organes aériens (PYFROM, APPLEMAN et HEIM, 1957 ; MASSINI, 1958 ; RACUSEN, 1958).

L'élongation des jeunes feuilles formées après le traitement est diminuée, mais elles demeurent turgescentes ; en outre, elles sont pratiquement dépourvues de chlorophylles. Ainsi, quand des germinations de Blé (WOLF, 1960), de Tournesol ou d'Orge, des plants de Pomme de Terre (HEIM et *al.*, 1956 ; PYFROM et *al.*, 1957) sont traités par l'AT à des concentrations de 10^{-5} à 10^{-4} M, la teneur en chlorophylles des jeunes tissus foliaires formés après l'action de l'AT ne représente que 1 à 5 % de celle des témoins. La dessiccation des plantes traitées ne survient que pour des concentrations en AT relativement élevées, c'est-à-dire de 10^{-2} à 10^{-1} M (HALL et *al.*, 1954 ; MINTON, PRESTON et ORGELL, 1958).

Si l'on tient compte du fait que seuls les jeunes organes nouvellement formés sont chlorotiques, alors que les tissus déjà différenciés au moment du traitement des plantes restent normalement verts, il apparaît que le blanchiment des feuilles résulterait d'une inhibition de la biosynthèse des chlorophylles plutôt que de la destruction de ces pigments. C'est ainsi que HALL et *al.*, en 1954, et PASTAC, en 1959, pour expliquer cette action, ont suggéré l'idée d'une analogie de structure de l'AT avec le noyau pyrrol. L'AT pourrait inhiber la synthèse de la protochlorophylle par un mécanisme de compétition. Comme argument en faveur de cette hypothèse, on peut citer la nette diminution de l'activité catalasique des broyats de divers tissus animaux ou végétaux préalablement traités par l'AT (HEIM et *al.*, 1956 ; PYFROM et *al.*, 1957 ; FEINSTEIN, BERLINER et GREEN, 1958 ; AUERBACH, PIERINGER et WAISMAN, 1959), le groupe prosthétiquique de la catalase étant de structure tétrapyrrolique. Par ailleurs, le fait que l'activité acide δ -aminolévulinique déshydrogénase du foie de Souris est réduite, après injection de l'AT à l'animal (TSCHUDY et COLLINS, 1957), conduit à penser à l'éventualité d'une action directe de l'AT sur la synthèse même des groupements tétrapyrroliques. Cependant, la baisse, dans les tissus, du taux des substances à porphyrines, sous l'action de l'AT, ne semble pas être générale et systématique (HEIM et *al.*, 1956) ; en outre, dans plusieurs expériences, il apparaît que la diminution de l'activité de la catalase est due à une inactivation par l'AT de l'enzyme préexistant dans les tissus (PYFROM et *al.*, 1957 ; MARGOLASH et NOVOGRODSKY, 1958). Jusqu'à présent, l'hypothèse d'une action directe de l'AT sur la synthèse des pigments chlorophylliens n'a pas reçu d'autres preuves expérimentales.

Comme la diminution de la synthèse des chlorophylles dans les tissus traités par l'AT est accompagnée également d'une diminution de la synthèse des caroténoïdes (WOLF, 1960), d'autres auteurs ont pensé que l'inhibition de la synthèse des pigments chloroplastiques n'est que la conséquence de la suppression par l'AT du développement normal des chloroplastes (ROGERS, 1957 ; PYFROM et *al.*, 1957 ; WOLF, 1960). En effet, l'examen au microscope des tissus chlorotiques de diverses plantes traitées par l'AT, montre que les chloroplastes y sont peu nombreux et mal formés (LINSEY et KIERMAYER, 1957 ; PYFROM et *al.*, 1957). Des travaux plus

récents en microscopie électronique révèlent que les tissus dépigmentés de germinations de Blé ou de Maïs traitées par l'AT ne renferment pas de chloroplastes normalement constitués. Ou bien, ceux-ci apparaissent comme vides, complètement perméables aux électrons, après fixation à l'acide osmique, ou bien, ils présentent des vestiges d'un système lamellaire qui paraît très désorganisé (JACOBSON et ROGERS, 1961 ; BARTELS, 1964 ; GUILLOT-SALOMON, 1966).

L'AT inhibe aussi l'élongation des racines (GASCHEN, 1963).

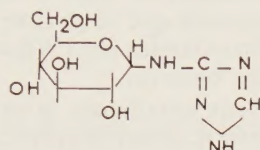
L'action de l'AT sur la croissance et la teneur en pigments de quelques microorganismes a été également étudiée. A des concentrations de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} M, l'AT inhibe fortement la multiplication cellulaire de plusieurs microorganismes photosynthétiques ou non (voir GUÉRIN-DUMARTRAIT, 1966). D'autre part, GUÉRIN-DUMARTRAIT a pu constater une forte inhibition de la division cellulaire des Chlorelles en cultures synchrones quand l'AT, à la concentration de $4 \cdot 10^{-4}$ M, est ajouté au milieu au cours des 8 premières heures d'illumination. L'AT agit rapidement aussi sur la synthèse des chlorophylles. Cette synthèse peut être presque totalement inhibée en quelques heures d'illumination, cependant, la dépigmentation des cellules est faible à cause du blocage des divisions cellulaires.

L'AT provoque une exaltation des échanges gazeux respiratoires dès son entrée dans les tissus de coléoptiles d'Avoine (HALL et *al.*, 1954) ou de feuilles de Coton et de Chardon (HALL et *al.*, 1954 ; MILLER et HALL, 1957 ; HERRETT et LINCK, 1957). L'intensité respiratoire diminue ensuite au cours du temps jusqu'à retrouver sensiblement sa valeur initiale. Une exaltation de l'intensité respiratoire est également observée dans les feuilles de Maïs rendues chlorotiques par action de l'AT (McWHORTER et PORTER, 1960) ou dans des cultures de Chlorelles dont la division est bloquée par l'AT (GUÉRIN-DUMARTRAIT, 1966). En mesurant les quotients respiratoires (QR) des algues ou des feuilles de Maïs, les mêmes auteurs ont obtenu des valeurs moyennes de 0,8. Il semble que les oxydations cellulaires y ont pour substrat, au moins en partie, des lipides ou des protéines.

Cependant, une importante diminution de la teneur en oses et en saccharose a été observée par HALL et *al.*, en 1954, dans les organes aériens de plants de Coton soumis à l'action de l'AT. Selon GUÉRIN-DUMARTRAIT (1966), dans les Chlorelles traitées, l'incorporation du ^{14}C dans les glucides solubles (glucose, fructose et saccharose), en 30 mn, est réduite d'environ 95 % par rapport aux témoins. En outre, la teneur en N protéique des tissus dépigmentés des germinations de Maïs ou de Blé, ainsi que celle des Chlorelles cultivées en présence d'AT, est nettement plus faible que celle des plantes supérieures et des Algues non traitées. Récemment, GUILLOT-SALOMON, SIGNOL et DOUCE (1966) ont observé de profondes modifications dans la composition en lipides polaires des feuilles de Maïs blanchies par l'AT, notamment une disparition presque totale des lipides nécessaires à l'édification des membranes et des lamelles plastidiales, à savoir le phosphatidylglycérol, les galactolipides et les sulfolipides, d'après WINTERMANS (1960), SHIBUYA et HASE (1965), SHIBUYA, MARUO et BENSON (1965). L'absence de synthèse de ces substances, ainsi que la réduction de la teneur en protéines, pourrait expliquer les malformations des chloroplastes dans les tissus foliaires formés en présence d'AT. Cependant, GUILLOT-SALOMON (1966) a signalé, dans les feuilles de Maïs blanchies par l'AT, une augmentation de la densité des ribosomes dans le cytoplasme. L'action de l'AT sur la synthèse des différentes substances protoplasmiques et paraplasmaïques est donc complexe et ne peut être réduite en une seule modalité.

En étudiant l'absorption, les migrations et le métabolisme de l'AT, CARTER

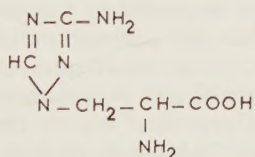
et NAYLOR (1960) ont constaté que l'AT radioactif est transformé dès sa pénétration dans les feuilles de Haricot. Cependant, la proportion d'AT qui reste non métabolisé augmente avec le temps, indiquant une absorption qui est plus rapide que la transformation. Selon HERRETT et LINCK (1961), dans les feuilles de Chardon ou de Liseron, il se forme des composés stables entre l'AT et le glucose. FREDRICK et GENTILE (1961) ont identifié un complexe comme étant le glucose-1-3-amino-1,2,4-triazol. La formation non enzymatique d'une liaison glucosylamine à partir d'AT



glucose-1-3-amino-1,2,4-triazol

et de glucose ou de glucose-1-phosphate a même été obtenue *in vitro*, à pH 6,8 et à 30 °C (GENTILE et FREDRICK, 1959 ; FREDRICK et GENTILE, 1960 *a*) ; ce composé à liaison glucosylamine peut être phosphorylé par action de l'hexokinase, bien que l'affinité de l'enzyme pour ce substrat soit beaucoup plus faible que pour le glucose (GENTILE et FREDRICK, 1959 ; FREDRICK et GENTILE, 1962). La formation de la liaison glucosylamine pourrait expliquer les perturbations du métabolisme glucidique observées sous l'effet de l'AT.

En outre, la présence d'une autre catégorie de combinaisons de l'AT, renfermant le cycle de l'AT lié à un acide aminé, a été mise en évidence dans les organes végétatifs de diverses plantes, notamment dans les feuilles de Haricot (RACUSEN, 1958) ou de Chardon et de Liseron (HERRETT et LINCK, 1961). La glycine et la sérine peuvent entrer dans la formation de ces composés, dans les germinations de Haricot et de Tomate, selon les constatations faites par CARTER et NAYLOR (1961 *a* et *b*), MASSINI (1963) et de nouveau par CARTER (1965), en utilisant des molécules marquées par ^{14}C . Un de ces composés a été caractérisé par MASSINI. Il s'agit de la β (3-amino-1,2,4-triazolyl-1)- α -alanine et elle est considérée par cet auteur comme la



β (3-amino-1,2,4-triazolyl-1)- α -alanine

combinaison principale de l'AT dans les plants de Haricot et de Tomate. WILLIAM COX et EAGON (1965) ont pu également obtenir une biosynthèse de ce composé par *Escherichia coli* cultivé en présence d'AT.

Enfin, dans les organes reproductifs — bourgeons, fleurs et jeunes fruits — de Haricots traités par l'AT-5- ^{14}C , SHIMABUKURO et LINCK (1965) n'ont pas trouvé de composé radioactif de l'AT ; par contre, presque toute la radioactivité (entre 80 et 95 %) de l'AT est retrouvée dans des substances biochimiques courantes, particulièrement dans le glucose, le fructose et surtout le saccharose. Selon ces auteurs,

alors que les organes végétatifs des plants de Haricot peuvent former des complexes AT-acides aminés, les organes de reproduction semblent posséder un système capable de dégrader la molécule d'AT pour en incorporer le carbone dans des métabolites usuels.

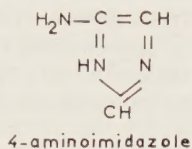
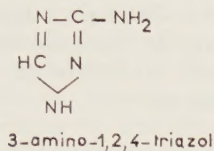
Etant donné la non-phytotoxicité des composés stables formés entre l'AT et un acide aminé et l'irréversibilité de leur biosynthèse, de nombreux auteurs ont voulu attribuer une signification physiologique à leur formation et les considèrent souvent comme étant des produits de désintoxication. Cela n'empêche pas qu'une fixation par l'AT de métabolites aussi importants que la glycine, la sérine ou même le glucose, dans le cas de la liaison glucosylamine de l'AT, peut être responsable, du moins en partie, des effets toxiques observés.

L'AT peut encore chélater les ions métalliques. SUND (1956) a signalé que l'AT peut former des complexes stables avec le cobalt, le cuivre, le nickel, le fer et le magnésium, sans préciser d'ailleurs les méthodes qui lui ont permis d'arriver à cette conclusion. Par la suite, MENORET et TRACEZ (1957), au moyen de réactions analytiques qualitatives d'une part, ont pu mettre en évidence le pouvoir chélateur de l'AT mis en présence des ions fer (ferrique), nickel et cuivre. D'autre part, par polarographie, ils ont pu confirmer l'existence des complexes avec le nickel et le cuivre ; les ions cobalt et magnésium semblent donner avec l'AT des complexes de faible stabilité. Plusieurs expériences montrent que l'inhibition par l'AT de l'activité de quelques enzymes, *in vitro*, est due à cette affinité de l'AT pour certains ions métalliques. Ainsi, la phosphorylase extraite de l'*Oscillatoria princeps* et inhibée par l'AT, *in vitro*, retrouve presque entièrement son activité par addition au milieu réactionnel d'ions manganèse ou d'ions ferriques, dans des proportions stoechiométriques avec les chélats di ou trivalents. Si, au contraire, l'enzyme est ajouté à un milieu réactionnel déjà enrichi en ces ions, son activité n'est pas diminuée par la présence d'AT (FREDRICK et GENTILE, 1960 b).

La formation d'un complexe ionique typique entre l'AT et la catalase ferrique a été décrite par NICHOLLS (1962). CASTELFRANCO (1960) explique par une réaction analogue l'action inhibitrice de l'AT sur l'activité de la tyrosinase et de quelques peroxydases.

La chélation de certains ions métalliques par l'AT peut donc provoquer d'importantes perturbations du métabolisme cellulaire. Cela explique en partie les observations de MENORET (1957) selon lesquelles la toxicité d'une solution d'AT vis-à-vis de plants de Tomate est réduite par addition de sels de cuivre, de nickel ou de cobalt, dans les proportions de 2 ions métalliques pour une molécule d'AT, cet effet étant plus ou moins complet suivant la concentration en AT utilisée ; les sels de fer (ferreux) et de magnésium sont sans action. Un antagonisme du fer ferreux vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'AT sur la division cellulaire et la synthèse des pigments d'*Ochromonas danica* est cependant constaté par AARONSON (1960). Pour cet auteur, une inhibition de la synthèse de la chlorophylle ou des enzymes contenant du fer (catalase, cytochrome), qui serait due à l'immobilisation du métal par l'AT, est possible. Si la formation de chélats métalliques peut avoir une importance physiologique dans quelques cas, il n'est pas démontré qu'elle soit un mode d'action fondamental de l'AT. En effet, l'arrosage quotidien des plants de Coton traités par l'AT avec des solutions de sels de Mg, Fe, Mn, n'empêche pas du tout l'apparition des symptômes chlorotiques (HALL *et al.*, 1954), de même que l'enrichissement du milieu de culture en sels de Cu, Ni, Co, Mn et Fe n'a pu apporter aucune atténuation aux effets inhibiteurs de l'AT sur la division cellulaire des Chlorelles (GUÉRIN-DUMARTRAIT, 1966).

Une dernière hypothèse plus récente, concernant le mode d'action de l'AT, est basée sur la similitude de structure entre l'AT et le 4-aminoimidazole. L'AT pourrait ainsi, par compétition, perturber le métabolisme des purines.



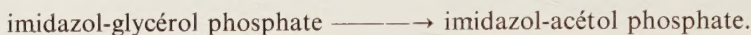
Les recherches, dans ce domaine, ont été surtout des essais de levée de l'action inhibitrice de l'AT par des purines ou des dérivés puriques. Ainsi, l'histidine, dérivé métabolique de l'adénine, peut annuler les effets inhibiteurs de l'AT sur la multiplication de quelques Levures (HILTON, 1960 ; WEYTER et BROQUIST, 1960) et d'une algue non chlorophyllienne, *Prototheca zopfii* (CASSELTON, 1964). En association avec l'adénine, l'histidine produit un effet semblable sur *Escherichia coli* (WEYTER et BROQUIST, 1960 ; BOND et AKERS, 1961). Pour les organismes photosynthétiques, il a été signalé un seul cas d'antagonisme entre l'histidine et l'AT, celui de *Chlorella vulgaris* (SIEGEL et GENTILE, 1966). Par contre, l'adénine s'opposerait partiellement à l'action inhibitrice de l'AT sur la division cellulaire de *Chlorella pyrenoidosa* (WOLF, 1962) et de *Scenedesmus quadricauda* (CASTELFRANCO et BISALPUTRA, 1965) ; chez ce dernier, l'inhibition de la chlorophyllogénèse serait levée en même temps que celle de la division cellulaire. La croissance des parties jeunes de plants de Tomate serait aussi moins inhibée par l'AT, en présence d'adénine (SUND, PUTALA et LITTLE, 1960).

D'autres substances puriques, notamment la guanine, l'hypoxanthine, les nucléosides puriques ainsi que le 4-aminoimidazole, pour des concentrations sensiblement équimoléculaires, s'opposent également aux effets inhibiteurs de l'AT sur la croissance (SUND, PUTALA et LITTLE, 1960).

En outre, les mêmes auteurs ont constaté que la riboflavine atténue, chez les plants de Tomate, la chlorose et l'inhibition de croissance dues à l'AT ; la flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) produisent le même effet. HILTON (1962) a pu montrer aussi qu'en présence de ces 3 substances, des plantes supérieures très diverses (Orge, Blé, Maïs, Avoine, Concombre, Soja) sont presque insensibles à l'action de l'AT. Selon HILTON, cet antagonisme entre la riboflavine et l'AT est bien dû à un effet physiologique et non à une photoinactivation de l'AT par la riboflavine. D'ailleurs, d'après SEXTON (1963), la biosynthèse des flavines et des purines procéderait de réactions initiales communes. Une inhibition de 20 à 80 % de la biosynthèse de la riboflavine a été mise en évidence par SUND et LITTLE (1960) dans *Eremothecium ashbyi* traité par l'AT, ainsi que dans des germinations de Pois et de Maïs rendues chlorotiques par l'herbicide.

Selon RABINOWITZ et PRICER (1956), l'utilisation des purines pourrait être perturbée par l'AT car ils ont obtenu, en présence de l'inhibiteur, un blocage très marqué de la conversion enzymatique du 4-aminoimidazole en formiminoglycine, chez le *Clostridium cylindrosporum* ; l'inhibition de la 4-aminoimidazole hydrolase par l'AT est alors très nette.

En ce qui concerne la biosynthèse de l'histidine, divers auteurs ont constaté qu'un précurseur de cette substance, l'imidazol-glycérol phosphate, s'accumule, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou la bactérie *Salmonella typhimurium*, lorsqu'elles sont inhibées par l'AT dans leur division cellulaire (HILTON, KEARNEY et AMES, 1965 ; KLOPOTOWSKI et WIATER, 1965). Ces résultats ont été confirmés par SIEGEL et GENTILE (1966), chez deux algues, *Chlorella vulgaris* et *Prototheca zopfii* ; ils seraient la conséquence d'une inhibition de l'imidazol-glycérol phosphate déshydratase, car HILTON et *al.*, (1965) ainsi que KLOPOTOWSKI et *al.*, (1965) ont pu inhiber, *in vitro*, en présence d'AT, la réaction



Enfin, dans ces dernières années, l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques par l'AT a été mise en évidence dans des germinations de Pois (SCHWEIZER et ROGERS, 1964) et de Blé (BARTELS et WOLF, 1965) ainsi que dans des cultures de Chlorelles (GUÉRIN-DUMARTRAIT, 1966).

Les faits sont donc nombreux en faveur de l'hypothèse d'une perturbation par l'AT du métabolisme des bases puriques — synthèse ou utilisation dans la genèse des acides nucléiques — et il semble qu'il s'agisse là de son mode d'action principal.

Devant la multiplicité apparente des effets de l'AT, il est légitime de poser les deux questions suivantes :

a) Est-ce que ces multiples effets sont dus à des actions directes du toxique sur des métabolites ou des cofacteurs différents ? On en a l'impression, si l'on pense à la faculté de l'AT de pouvoir former des chélats métalliques ou de fixer des métabolites aussi importants que la glycine, la sérine ou même le glucose.

b) Est-ce que les nombreux types d'action de l'AT ne dérivent pas d'une action primaire sur la synthèse des acides nucléiques, la multiplicité apparente découlant du rôle général de ces composés dans la synthèse de toutes les protéines-enzymes.

Les deux modalités pourraient d'ailleurs être possibles parallèlement.

Au cours du présent travail, après avoir précisé les conditions du ralentissement de la croissance et de l'inhibition de la pigmentogenèse, sous l'effet de l'AT, j'ai cherché à éclairer les précédents points de vue, notamment par l'étude de quelques aspects de l'action de l'AT sur le métabolisme intermédiaire, photosynthèse ou respiration, d'une Graminée, l'*Oryza sativa* L. Après la mesure des activités photosynthétique et respiratoire des feuilles formées en présence d'AT, comparées à celles des feuilles témoins, il a paru intéressant d'étudier la fixation du ^{32}P par ces organes, à l'obscurité et à la lumière, ainsi que quelques activités enzymatiques liées à leurs mécanismes. De même, sont examinées les modifications, sous l'action de l'AT, des propriétés des chloroplastes et des mitochondries isolés *in vitro*, en étudiant une réaction de HILL et les phosphorylations photosynthétique et oxydative réalisées par ces organites. Ces propriétés ont été étudiées d'une part avec des organites prélevés sur des feuilles intactes, mis en présence d'AT ou non, et d'autre part, avec des organites extraits de feuilles provenant de plantes traitées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. MATÉRIEL

Il est constitué principalement par des feuilles d'*Oryza sativa* L. (variété Balilla) fourni par la Station de Recherches agronomiques du Sud-Est (Cantarel-Montfayet). L'étude de la phosphorylation photosynthétique a été réalisée, en plus, avec des chloroplastes isolés de *Spinacia oleracea* L. et de *Bryophyllum daigremontianum* Berger. Les expériences de phosphorylation oxydative ont été faites avec des mitochondries isolées d'hypocotyles de *Cucumis sativus* L., variété Vert long Rollisson's Telegraph.

II. MÉTHODES ET TECHNIQUES

A. Germinations et cultures

1) Les graines d'*Oryza sativa* L., triées et stérilisées (trempage pendant 10 mn dans l'alcool éthylique à 70 %, puis, pendant une heure, dans de l'eau oxygénée à 0,6 %), sont mises à germer en atmosphère saturée d'humidité pendant 12 jours.

Les plantes les plus semblables (environ 6 cm) sont alors repiquées dans de petits bacs en matière plastique contenant du gravier de quartz inerte lavé et du milieu nutritif. Le milieu de culture, à pH 4,4, est préparé selon la formule I d'HOAGLAND-ARNON (voir HOMÈS, ANSIAUX et Van SCHOOR, 1953) et renferme $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $4 \text{ H}_2\text{O}$ $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (1,172 g/l), KNO_3 $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (0,505 g/l), KPO_4H_2 10^{-3} M (0,136 g/l) et MgSO_4 , $7 \text{ H}_2\text{O}$ 10^{-3} M (0,246 g/l). Les oligo-éléments, fournis par les solutions-mères A_5 et B_6 d'ARNON (1938) sont ajoutés à raison de 1 cm³ de chaque solution par litre de milieu. La concentration en fer nécessaire (3,6 mg/l) est fournie par addition d'une solution à 0,5 % de FeSO_4 , $7 \text{ H}_2\text{O}$ dans de l'acide tartrique à 0,4 %.

Le renouvellement de la solution nutritive se fait tous les 15 jours.

Les cultures sont faites en serres, l'éclairage est apporté par la lumière du jour et la température moyenne est d'environ 25 °C.

Après 2 mois, les plantes possèdent 6 feuilles au limbe bien déroulé. C'est alors que se fait le traitement par l'aminotriazol.

2) Les graines de *Cucumis sativus* L. sont mises à germer, sans trempage préalable, à l'étuve, à 28 °C et à l'obscurité, sur papier filtre humide, pendant 7 à 8 jours.

B. Traitement par le 3-amino-1,2,4-triazol

1) Les germinations de Concombre, âgées de 36 h à 96 h, sont arrosées et laissées en contact pendant 4 jours avec le 3-amino-1,2,4-triazol, produit pur à 98 % fourni par KOCH, Lab. LTD ; différentes concentrations (de $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ à $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) sont essayées.

2) Pour les cultures de Riz, le traitement se fait en ajoutant l'AT à la solution nutritive, au moment d'un renouvellement, à des concentrations comprises entre $1,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ et $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (c'est-à-dire entre 0,1 mg et 100 mg par litre de milieu).

Le traitement dure de 15 à 30 jours. Les feuilles formées pendant cette période sont alors prélevées et utilisées pour diverses études et analyses.

C. Mesure de la croissance des feuilles

La masse de substance foliaire fraîche est déterminée ainsi que la masse de substance sèche après dessiccation de 20 feuilles à 80 °C jusqu'à poids constant. Les mesures de la longueur moyenne des cellules épidermiques sont faites au microscope ordinaire sur des coupes tangentielles à main levée, immergées dans le liquide isotonique de RINGER.

D. Mesure des échanges gazeux respiratoires et photosynthétiques

Les intensités respiratoires (IR) et photosynthétiques (IP) des feuilles, mesurées respectivement par les volumes d'O₂ absorbé à l'obscurité ou émis à la lumière, sont déterminées par la méthode directe de WARBURG.

Les 8^e feuilles des plantes témoins et traitées par l'AT, lavées à l'eau bidistillée et séchées, sont coupées en fragments de 3 cm et mises à flotter sur un liquide tampon carbonate-bicarbonate : K₂CO₃ 0,1 M (15 parties), KHCO₃ 0,1 M (85 parties) (EMERSON et ARNOLD, 1932).

L'absorption respiratoire d'O₂ est mesurée pendant 1 h à l'obscurité ; l'émission photosynthétique d'O₂ (éclairage : 2 000 lx) est mesurée immédiatement après, pendant 30 mn. La température est de 25 °C.

E. Méthodes et techniques d'analyses chimiques

1) Pigments

L'extraction des pigments est faite à 0 °C, à l'obscurité autant que possible. Les feuilles sont broyées dans un mortier en présence de sable et d'acétone jusqu'à ce que le broyat soit incolore. Après centrifugation, le surnageant est recueilli, jaugé, et le volume d'eau nécessaire est ajouté pour avoir une solution acétonique à 80 %.

Les densités optiques de l'extrait acétonique à 645 mμ (D₆₄₅), à 663 mμ (D₆₆₃) et à 460 mμ (D₄₆₀) sont mesurées au spectrophotomètre JOBIN-YVON. Les concentrations de cet extrait en chlorophylle *a* et en chlorophylle *b*, exprimées en g/l, sont données par les formules de McKINNEY (McKINNEY, 1941 ; ARNON 1949).

$$\text{chl } a = 0,0127 D_{663} - 0,00269 D_{645}$$

$$\text{chl } b = 0,0229 D_{645} - 0,00468 D_{663}$$

$$\text{chl } a + \text{chl } b = 0,0201 D_{645} + 0,00801 D_{663}.$$

La concentration globale en caroténoïdes, exprimée en g/l, est calculée selon la formule établie par GUÉRIN-DUMARTRAIT (1966) d'après les coefficients déterminés par McKINNEY.

$$\text{Concentration en caroténoïdes} = \frac{D_{460} - [(\text{chl}_a \times 3,19) + (\text{chl}_b \times 130,3)]}{200}$$

Les pigments sont transférés de l'acétone dans l'éther éthylique par décantation en présence d'un courant d'eau s'écoulant goutte à goutte. Deux phases sont ainsi obtenues : une phase colorée, constituée par la solution de pigments dans l'éther et une phase incolore, formée d'acétone et d'eau. Après élimination de l'éther éthylique par évaporation sous vide, les pigments sont dissous dans l'éther de pétrole

puis séparés par chromatographie sur colonne de cellulose suivant la technique de LEFRANÇOIS (1960). L'élution est faite par l'éther de pétrole d'abord pur, puis additionné de 2 %, 4 %, 6 %, 8 % et enfin 12 % d'acétone.

2) Dosages d'azote

Les teneurs des feuilles en N organique total, en N soluble et en N protéique sont déterminées par une méthode voisine de celle décrite par MOYSE (1950 a).

a) *N organique total*. Après dessiccation à 70 °C, les feuilles sont broyées au mortier et réduites en poudre fine. Elles sont alors minéralisées à chaud par H₂SO₄, selon KJELDAHL, en présence du catalyseur au sélénite de Hg de DUMAZERT et MARCELET (1938). Le chauffage est poursuivi pendant 6 h après la décoloration complète du contenu des matras. L'ammoniaque est distillée dans l'appareil de PARNAS-WAGNER et recueillie dans l'acide borique à 2 % où elle est titrée par H₂SO₄ N/35.

b) *N protéique*. La poudre fine de feuilles est traitée par l'eau à trois reprises, à 80 °C, au bain-marie (volume de liquide au moins 10 fois plus grand que celui de la poudre) : l'épuisement des tissus en composés azotés solubles est ainsi complet et il n'est pratiquement pas extrait de chlorophylle. Les protéines, qui ont pu être dissoutes, sont précipitées par l'acide trichloracétique (TCA) à 10 % amené à la concentration de 2,5 %.

c) *N soluble total*. Une partie aliquote de l'extrait soluble est d'abord traitée par l'acide phényl sulfurique en présence de poudre de Zn pendant 24 h afin d'assurer la réduction totale de l'ion nitrique, puis minéralisée et dosée comme il est décrit ci-dessus.

3) Produits formés après incorporation du ³²P

Les limbes des feuilles sont prélevés en les coupant au ras de la gaine sur une longueur de 12 cm. Après avoir reçu le ³²P par infiltration sous vide d'une solution de ³²PO₄H₃, ils sont disposés dans une enceinte humide, à 25 °C, et laissés à l'obscurité, ou illuminés, soit pendant des temps différents, soit à différentes intensités lumineuses.

Après chaque traitement, les limbes sont fixés par projection dans l'alcool méthylique à 80 % bouillant, pendant 15 mn, ce qui permet de dénaturer les phosphatases et d'éviter ainsi l'hydrolyse des esters phosphorylés (ALBAUM, 1952 ; BENSON, 1955).

Les limbes, immédiatement séparés de l'alcool de fixation afin d'éviter toute action ultérieure des phosphatases (BEAN cité par BENSON, 1955), sont desséchés à 35 °C, pendant 24 h. Après broyage des feuilles en poudre fine, deux extractions par le méthanol à 20 % bouillant, pendant 10 mn, achèvent l'entraînement de l'acide phosphoglycérique (PGA) et des oses phosphorylés (BENSON, 1955).

Tous les extraits sont réunis et mis à concentrer sous pression réduite, dans un évaporateur rotatif, à une température maximum de 25 °C, afin de ne pas provoquer l'hydrolyse des composés thermolabiles.

L'extrait soluble total est analysé par chromatographie bidimensionnelle sur papier d'Arches n° 304. Les solvants utilisés sont, pour la première dimension, le mélange phénol-eau, 72-28 (en masse), et pour la 2^e dimension, le mélange n-butanol-

acide acétique-eau, 74-19-50 (en volume), fraîchement préparé, mélange spécialement efficace pour séparer les composés phosphorylés (BENSON, BASSHAM, CALVIN, GOODALE, HAAS et STEPKA, 1950).

Les substances radioactives sont localisées sur les chromatogrammes par autoradiographie sur du film Kodirex. L'identification de ces substances, indiquée en première approximation par des cartes chromatographiques (BENSON, 1955 ; BASSHAM et CALVIN, 1959), est contrôlée par cochromatographie avec des substances témoins. Elle est confirmée par des réactions colorées spécifiques : l'ion phosphorique est révélé avec le réactif au molybdate de NH_4 de HANES et ISHERWOOD (1949), selon BANDURSKI et AXELROD (1951), la radical acide organique, par la réaction au bleu de bromophénol (JOLCHINE, 1956) et le radical glucidique par la réaction à la p-anisidine phosphate (MUKHERJEE et SRIVASTAVA, 1952) et à l'orcinol trichloracétique (KLEVSTRAND et NORDAL, 1950).

Après élution par l'eau, les radioactivités des substances identifiées sont mesurées au compteur Geiger-Müller (CRC) à fenêtre de mica mince de $1,9 \text{ mg/cm}^2$ (rendement 8 %).

En raison de la courte période du ^{32}P ($T = 14,5$ jours), les comptages sont tous recalculés pour le temps $t = 0$ où les feuilles ont reçu le ^{32}P . La relation exponentielle de décroissance utilisée est la suivante :

$$\log \frac{N_0}{N} = \log \lambda t$$

$$\log \frac{N_0}{N} = \frac{1}{2,3} \cdot \lambda t$$

où N_0 = radioactivité au temps 0.

N = radioactivité mesurée au temps t .

t = temps en jours depuis le temps 0.

$$\lambda = \frac{0,693}{T} = \text{constante de décroissance.}$$

4) Dosages des glucides solubles

L'extrait soluble total, obtenu comme il a été décrit ci-dessus, est fractionné à l'aide de résines échangeurs d'ions selon la technique de JOLCHINE (1956) : l'extrait aqueux passe sur une colonne de résine cationique (Duolite C_{20}) qui retient les acides aminés et les cations minéraux, puis, sur une colonne de résine anionique (Duolite A_6) qui fixe les anions minéraux et organiques (acides organiques et composés phosphorylés) ; l'effluent final renferme les substances neutres telles que les glucides et certains polypeptides de poids moléculaire moyen.

Les glucides réducteurs libres sont alors dosés directement par la méthode colorimétrique de NELSON (1944), utilisant la formation de l'oxyde cuivreux et la coloration de l'oxydure par l'arsénomolybdate.

L'hydrolyse acide douce est faite en portant la liqueur à pH 2 par addition de 2 gouttes d' HCl et en la laissant 10 mn au bain-marie, à l'ébullition ; après neutralisation par NaOH , la liqueur est dosée selon NELSON. Dans ces conditions, l'hydrolyse du saccharose est totale, mais une partie du fructose peut se trouver détruite en

milieu acide à chaud. Les valeurs obtenues après l'hydrolyse acide douce, diminuées de celles obtenues après dosage direct, peuvent ne pas correspondre rigoureusement à la quantité de saccharose ; cependant, elles sont ici considérées comme telles.

F. Méthodes et techniques d'étude des activités des organites cellulaires isolés

1) Extraction par centrifugation différentielle

a) Pour le Riz et l'Epinard, les chloroplastes sont isolés selon la méthode de JAGENDORF et AVRON (1958) dans du tampon Tris [tri(hydroxyméthyl)aminométhane] 0,05 M pH 7,8, Saccharose 0,4 M, ClNa 0,01 M. Pour le *Bryophyllum*, la technique employée est celle de MASLOW (1964).

Le broyage est effectué au broyeur « Turmix » dans un volume de tampon double du poids de substance fraîche des feuilles (Epinard et *Bryophyllum*) ou quadruple (Riz). Le broyat est filtré sur gaze et coton, puis centrifugé à 200 g, pendant 2 mn, pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est centrifugé à 1000 g, pendant 7 mn ; les chloroplastes sédimentés sont remis en suspension dans le même tampon et conservés à l'obscurité et au froid (+ 2 °C). Toutes ces opérations se font en chambre froide à + 2 °C et dans une centrifugeuse réfrigérée.

b) Les mitochondries d'hypocotyles de Concombre sont séparées suivant la méthode de STENLID et SADDIK (1962), avec quelques modifications. Le matériel frais pesant X grammes est broyé au mortier, sans addition de sable, en présence d'un volume égal à 1,5 X ml de tampon Tris 0,1 M pH 8, Saccharose 0,4 M, EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) 0,01 M. Le broyat, filtré sur gaze et coton, est centrifugé à 1 000 g, pendant 15 mn, puis à 10 000 g, pendant 20 mn. Le tampon de lavage et de suspension des mitochondries est une solution de saccharose 0,3 M et de tampon Tris 0,03 M pH 7,4.

2) Analyse des organites isolés

La chlorophylle des suspensions de chloroplastes est dosée, après extraction des substances liposolubles dans l'acétone à 80 %, en mesurant la densité optique de la solution à 652 m μ (ARNON, 1949).

L'azote protéique chloroplastique ou mitochondrial, après précipitation par le TCA à 10 %, est minéralisé par H₂SO₄, en présence de H₂O₂, et déterminé colorimétriquement à l'aide du réactif de NESSLER (selon JOHNSON cité par UMBREIT et BURRIS, 1959).

3) Réaction de Hill

Le réactif de HILL fourni à la suspension de chloroplastes aqueux est, soit le ferri-cyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆], soit le 2,6-dichlorophénolindophénol (DPIP).

Dans le 1^{er} cas, les mesures du dégagement d'O₂ sont effectuées à 15 °C, pendant 20 mn, sous atmosphère d'azote, dans l'appareil de WARBURG, avec un éclairage d'environ 85 000 lx. Le milieu réactionnel contient, pour un volume total de 3 ml (en μ M) : NaCl : 60- Tampon Tris, pH 7 : 40- K₃Fe(CN)₆ : 30, et des chloroplastes contenant 250 μ g de chlorophylle (Chl).

Dans le 2^e cas, la réduction du DPIP en leucodérivé par les chloroplastes éclairés, est suivie par photolorimétrie à l'aide du dispositif réalisé et décrit par de KOUCHKOVSKY (1961). En voici une brève description. La cuve de l'appareil est remplie par un volume de suspension de chloroplastes correspondant à 40 μ g de Chl, du

tampon phosphate à pH 6,7 en quantité nécessaire pour ajuster le volume total à 2 ml et 10 μ l de solution de DPIP $2 \cdot 10^{-3}$ M contenant 0,01 % de KCl. L'éclairement est de 43 000 lx. Le faisceau analyseur, monochromatique (600 m μ), après avoir traversé la cuve, est reçu sur une cellule photoélectrique à couche d'arrêt. Le courant électrique correspondant est envoyé dans un galvanomètre enregistreur.

L'activité HILL (Q_H) est calculée en μ l d'O₂ dégagé par mg de Chl et par heure, en appliquant la formule empirique établie par de KOUCHKOVSKY (communication personnelle).

$$Q_H = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \quad \frac{3,2 \cdot 10^6}{X}$$

où Δt = durée d'éclairement de la suspension des chloroplastes, en secondes.

ΔDO = variation de la densité optique dans la cuve pendant cette durée.

X = concentration de la chlorophylle dans la cuve, en μ g/ml.

$3,2 \cdot 10^6$ = coefficient empirique de correspondance entre la variation de la DO du DPIP et le dégagement d'O₂.

4) Expériences de phosphorylation

a) *Phosphorylations photosynthétiques* : les expériences et les mesures du dégagement d'O₂ sont faites à 15 °C, sous atmosphère d'azote, pendant 10 à 30 mn, dans un appareil de WARBURG à cuve thermostatée en verre, éclairée par dessous à l'aide de 2 rangées de lampes Philips (Attralux Intensive, 300 W). Un éclairage bien uniforme de 85 000 lx est ainsi obtenu au niveau du fond des fioles. Malgré la forte intensité lumineuse, la régulation thermique arrive à être satisfaisante par l'emploi simultané d'un groupe réfrigérant FK 2300 Colora à froid continu et d'un groupe frigorifique thermostaté TK₁ Rheinische.

Le mélange réactionnel a la composition suivante (en μ M) : tampon Tris pH 7,8 : 40- MgCl₂ : 10- ADP : 10- Tampon phosphate pH 7,8 : 10- Phosphate à ³²P : 2 μ C correspondant à $2 \cdot 10^5$ imp/mn. On y ajoute du phénazine méthosulfate (PMS) : 0,1 μ M, ou bien du flavine mononucléotide (FMN) 0,5 μ M, ou de la vitamine K₃ : 0,3 μ M et des chloroplastes contenant 100 μ g de Chl (photophosphorylation cyclique), ou K₃Fe(CN)₆ : 15 μ M, ou NADP : 4 μ M et des chloroplastes correspondant à 250 μ g de Chl (photophosphorylation non cyclique). Le volume total du milieu réactionnel est toujours de 3 ml.

L'arrêt de la réaction se fait par extinction des lampes et addition de 0,3 ml d'une solution de TCA à 20 % dans l'eau au contenu de chaque fiole. Le mélange est centrifugé pendant 10 mn, à 5 000 g.

Le dosage de l'ATP formé est alors effectué avec le surnageant obtenu. La technique de précipitation du phosphate inorganique résiduel par le mélange magnésien selon LEPAGE (1959), suivie de filtration du précipité formé, est utilisée pour l'étude de la photophosphorylation couplée à la réduction du ferricyanure. Pour tous les autres types de phosphorylation, le dosage du phosphate organique est effectué selon la méthode de NIELSEN et LEHNINGER (1955), modifiée par AVRON (1960), en précipitant le phosphate minéral résiduel sous forme de phosphomolybdate de NH₄, lequel est ensuite entraîné par le mélange isobutanol-benzène, 1-1 (en volume).

b) *Phosphorylation oxydative* : les expériences et les mesures de l'absorption d'O₂ sont effectuées à 28 °C, pendant 20 mn, dans l'appareil de WARBURG, à l'obscurité.

Le milieu réactionnel, d'un volume de 3 ml, renferme (en μM) : Tampon Tris pH 7,4 : 20- Saccharose : 200- Succinate de sodium : 20- NaF : 20- MgCl_2 : 2- ATP : 5- Tampon phosphate pH 7,4 : 10- Phosphate à ^{32}P : 1 μC correspondant à 10^5 imp/mn. On y ajoute 0,5 ml de suspension mitochondriale correspondant à 500 μg environ d'azote protéique.

La réaction est déclenchée par addition dans le milieu réactionnel du mélange de glucose (100 μM) et d'hexokinase (300 unités KUNITZ-MCDONALD). Elle est arrêtée à l'aide de 0,3 ml de TCA à 20 %. Le contenu des fioles est centrifugé pendant 10 mn, à 10 000 g. Le phosphate organique de la fraction surnageante est alors dosé, après élimination du phosphate minéral, selon la méthode d'AVRON indiquée ci-dessus.

G. Méthodes et techniques d'étude des activités enzymatiques

1) Activité ribulose-diphosphate carboxylase

Les feuilles de Riz sont broyées au mortier avec un volume de tampon Tris 0,04 M pH 7,8 égal au poids de substance fraîche foliaire. Après filtration sur gaze et coton, le broyat est centrifugé à 200 g pendant 2 mn pour éliminer les gros débris cellulaires.

Les essais enzymatiques sont alors entrepris, dans des tubes gradués, suivant la méthode de WEISSBACH et HORECKER (1956), modifiée par SMILLIE (1962). Le mélange réactionnel, à pH 8, contient, pour un volume total de 1 ml (en μM) : Tampon Tris : 25- MgCl_2 : 10- EDTA : 0,26- GSH_2 (glutathion réduit) : 6- RuDP (ribulose 1,5-diphosphate) : 0,8- NaHCO_3 : 45, contenant 22,5 μC de ^{14}C . On y ajoute 0,25 ml de broyat de feuilles correspondant à 600 μg ou 300 μg environ d'N protéique. (Le sel de Ba du RuDP est transformé en sel de Na soluble après traitement par la résine cationique Dowex-50 et neutralisation. Le RuDP n'est pas ajouté au milieu réactionnel dans les essais témoins).

La réaction est déclenchée par l'addition de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Elle dure 10 mn, à la température de 22 °C et à la lumière ambiante (environ 500 lx). Elle est arrêtée par l'addition de 3 ml d'éthanol à 70 % bouillant, contenant 2 gouttes d'acide acétique glacial. Après refroidissement, le mélange est ajusté à 5 ml et la radioactivité d'une partie aliquote est déterminée au compteur Geiger-Müller. L'identification des substances formées est faite comme il a été indiqué précédemment (paragraphe E₃) avec, en plus, la réaction colorée à la ninhydrine pour les acides aminés (voir CHAMPIGNY, 1960).

2) Activités glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase

Les mesures des activités des 2 enzymes sont faites avec le broyat préparé de la façon indiquée ci-dessus. La méthode spectrophotométrique employée mesure l'augmentation de densité optique, à 340 μm , due à la réduction du NADP en présence de glucose-6-phosphate (G-6-P) et de 6-phosphogluconate (6-PG).

Les cuves ($d = 1$ cm), d'un volume réactionnel de 3 ml, renferment (en μM) : Tampon Tris pH 7,4 : 150 - MgCl_2 : 10 - NADP : 0,5- G-6-P ou 6-PG : 10. On y ajoute 0,5 ml de broyat foliaire correspondant à 60 μg ou 30 μg environ d'N protéique. La température est de 27 °C.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS

I. QUELQUES EFFETS DU 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOL SUR *ORYZA SATIVA* L.

A. Modifications observées en présence d'AT

1) Aspect morphologique

Après 2 mois de culture, lorsque les plantes ont 6 feuilles au limbe bien déroulé l'AT est ajouté à la solution nutritive aux concentrations de $1,2 \cdot 10^{-6}$ M, $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, $1,2 \cdot 10^{-4}$ M et $1,2 \cdot 10^{-3}$ M.

L'aspect et la croissance des plantes de Riz sont suivis pendant 15 à 30 jours.

A la concentration de $1,2 \cdot 10^{-6}$ M, l'AT n'exerce encore aucune action : les cultures témoins et traitées sont sans différence observable.

A la concentration de $1,2 \cdot 10^{-3}$ M, au bout de 3 jours, les feuilles commencent à montrer des pointes nécrosées ; le dessèchement se propage rapidement sur toutes les feuilles pour arriver finalement au chaume ; la mort survient ainsi au bout de 7 jours.

L'AT ne provoque plus de nécrose des tissus foliaires déjà formés, à la concentration de $1,2 \cdot 10^{-4}$ M, mais tandis que les plantes témoins ébauchent leur 7^e feuille, aucune ébauche foliaire n'apparaît sur les plantes traitées. Au bout de 30 jours, deux nouvelles feuilles se sont ainsi développées chez les plantes témoins, alors que les plantes traitées, toujours vivantes, avec toutes leurs feuilles adultes, sont incapables d'ébaucher de jeunes feuilles. Il y a donc arrêt de croissance, sans mort.

Les résultats les plus intéressants sont obtenus avec les concentrations en AT de $6 \cdot 10^{-5}$ M et $1,2 \cdot 10^{-5}$ M. Ici, l'ébauche foliaire apparaît bien sur les plantes traitées, mais elle n'arrive à l'état de feuille adulte (limbe bien déroulé) qu'à la plus faible des 2 concentrations en AT ; en d'autres termes, le rythme d'apparition des jeunes feuilles, très ralenti par l'AT à $6 \cdot 10^{-5}$ M, est presque normal quand l'AT est à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M. Les feuilles, formées après le traitement, sont plus courtes que celles du même âge, chez les plantes témoins. La diminution de la longueur des feuilles est représentée par le polygone de répartition des longueurs foliaires, obtenu en groupant les valeurs 10 par 10 (fig. 1). La longueur moyenne passe de 217 mm à 175 mm.

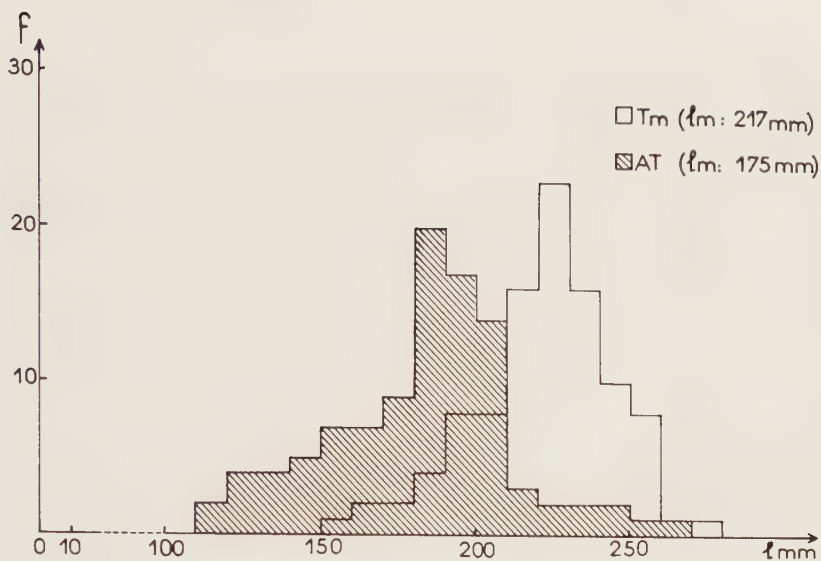
Il a paru intéressant de chercher à voir si cette diminution de la longueur des feuilles est due à une inhibition de la multiplication des cellules ou à une inhibition de leur élongation ; les longueurs des cellules épidermiques de feuilles de Riz ont été ainsi mesurées au microscope. Les parties basales, médianes et apicales des 8^e feuilles ont été observées séparément, et dans chaque cas, les mensurations ont porté sur cent cellules. La répartition des fréquences de longueurs mesurées dans les 2 types de feuilles est représentée par la figure 2.

FIG. 1. — Distribution des longueurs des 8^e feuilles d'*Oryza sativa* L., 30 jours après le traitement par $1,2 \cdot 10^{-5}$ M d'AT.

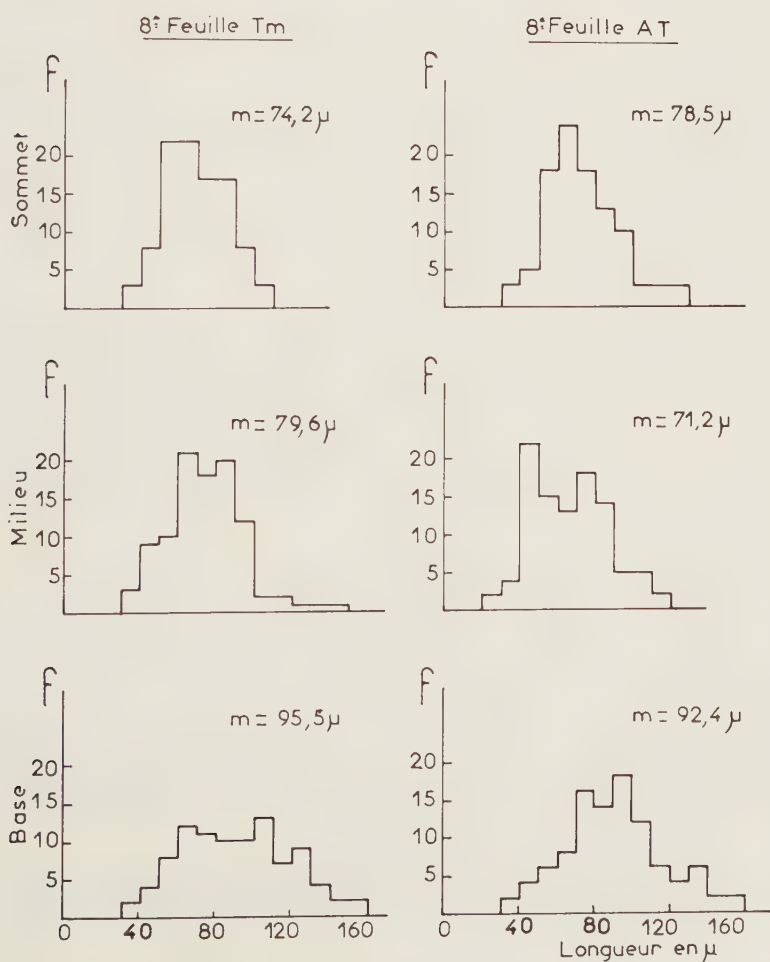
f : fréquence.	AT : 8 ^e feuilles formées en présence d'AT.
l mm : longueur des 8 ^e feuilles, en mm.	Tm : 8 ^e feuilles de plantes témoins.
l m : longueur moyenne des 8 ^e feuilles.	

FIG. 2. — Répartition des longueurs des cellules épidermiques dans les différentes parties des 8^e feuilles d'*Oryza sativa* L., 30 jours après le traitement par $1,2 \cdot 10^{-5}$ M d'AT.

f : fréquence.	AT : Formée en présence d'AT.
m : moyenne.	Tm : témoin.



◀ FIG. 1



◀ FIG. 2

La proportion de cellules épidermiques ayant une longueur supérieure à $100\ \mu$ est assez élevée à la base des feuilles témoins ; la longueur moyenne d'une cellule peut ainsi atteindre $95,5\ \mu$. Dans le milieu et vers la pointe, les longueurs inférieures à $100\ \mu$ dominent nettement, avec des moyennes comprises entre 80 et $70\ \mu$. La croissance semble donc maximale à la base des feuilles. Les mêmes faits se reproduisent dans les feuilles traitées, avec des valeurs moyennes sensiblement égales à celles des témoins ; manifestement, l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, n'a pas réduit la longueur des cellules épidermiques.

D'après ces résultats, *la diminution de longueur des feuilles traitées résulterait d'une diminution du nombre des divisions cellulaires plutôt que d'une inhibition de l'élongation des cellules.*

2) Composition des feuilles

Les plantes de Riz, âgées de 2 mois et ayant 6 feuilles bien déroulées, sont traitées par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M pendant 30 jours. Les 8^e feuilles déjà formées sont prélevées pour les diverses analyses.

a) *Masse de substance fraîche et de substance sèche, teneur en eau et principaux groupes de substances azotées* : les principaux résultats sont réunis dans le tableau I.

Les feuilles, formées pendant le traitement des plantes par l'AT, sont au moins aussi turgescentes que les témoins, sinon plus ; leur teneur en eau a même augmenté de 20 %. Cependant, elles se dessèchent relativement vite ; l'état adulte une fois atteint, leur durée de vie est limitée à 15 jours ou 3 semaines au maximum, alors que celle des feuilles témoins du même âge dépasse facilement 2 mois.

TABLEAU I

Variations de la masse de substance fraîche, de la masse de substance sèche, et des quantités d'N, pour 20 feuilles (N° 8) d'Oryza sativa L., témoins ou traitées par l'AT.

(Tm = témoins ; AT = formées en présence d'aminotriazol).

Variations correspondantes des teneurs en eau et en N par rapport au poids de substance sèche (% PS).

	8 ^e feuilles Tm		8 ^e feuilles AT	
	mg	% PS	mg	% PS
Masse de substance fraîche	808		664	
Masse de substance sèche	146		102	
Teneur en eau		453		550
N organique total	5,98	4,08	3,86	3,78
N protéique	5,12	3,49	2,48	2,43
N soluble total	0,86	0,59	1,38	1,35
N protéique	5,8		1,8	
N sol. total				

Les masses de substance fraîche et de substance sèche des feuilles traitées montrent une légère diminution (20 % et 30 % respectivement) par rapport aux feuilles non traitées.

De même, la quantité d'N total est réduite d'environ 30 %. Cette diminution est due essentiellement à celle de la quantité d'N protéique laquelle est réduite de

moitié par rapport aux témoins. Par contre, la quantité d'N soluble augmente de 60 % dans les feuilles traitées. La valeur du rapport N protéique/N soluble total décroît dans les feuilles formées pendant le traitement des plantes par l'AT.

La teneur en N total des feuilles traitées est très peu différente de celle des feuilles témoins, soit respectivement 3,8 % et 4 % de la masse de substance sèche. La différence s'accroît pour la teneur en N protéique ; alors que celle-ci représente 3,5 % de la masse de substance sèche ou encore 90 % de l'N total pour les témoins, la teneur en N protéique, des feuilles traitées, n'est plus que de 2,4 % de la masse de substance sèche, soit 60 % de l'N total. Au contraire, la teneur en N soluble total a plus que doublé dans les feuilles traitées.

En résumé, l'AT provoque une accumulation de l'N soluble et une chute de l'N protéique ; la masse de substance sèche des feuilles étant réduite de 30 %, sous l'action de l'AT, on peut calculer que le gain protéique (bilan) réalisé par les feuilles traitées est réduit d'environ 60 % par rapport aux témoins. La faiblesse du rapport N protéique/N soluble est également bien caractéristique du déficit de protéogénèse.

b) *Pigments* : les 6 feuilles déjà adultes, au moment du traitement des plantes, ne présentent aucune altération de leur pigmentation.

Par contre, les feuilles ou parties de feuilles, qui se forment en présence d'AT, au lieu d'être normalement vertes, sont de couleur blanc-jaune. Les 7^e feuilles de Riz possèdent ainsi, entre une pointe verte et une base incolore, une zone de transition dont la pigmentation varie du vert au blanc. Les 8^e feuilles sont entièrement blanches.

Les teneurs en pigments des diverses régions de la 7^e feuille de Riz traitée par l'AT, exprimées en pourcentage par rapport à celles des régions correspondantes de la 7^e feuille de Riz témoin, sont représentées par la figure 3 (page 174).

Les résultats les plus typiques du dosage des pigments de la 8^e feuille de Riz témoin et AT sont réunis dans le tableau II.

TABLEAU II

*Action inhibitrice de l'aminotriazol à 1,2.10** M sur la synthèse des chlorophylles et des caroténoïdes par les 8^e feuilles d'Oryza sativa L.*

Tm = témoins

AT = formées en présence d'aminotriazol

% PS = teneurs par rapport à la masse de substance sèche

	8 ^e feuilles Tm		8 ^e feuilles AT	
	µg (pour 20 feuilles)	% PS	µg (pour 20 feuilles)	% PS
Chlorophylles totales	2 340	1,64	140	0,14
Caroténoïdes	300	0,21	34	0,03
Chl a	2,9		2,7	
Chl b				
Chlorophylles totales	7,8		4,1	
Caroténoïdes				

La quantité de chlorophylles des feuilles traitées est diminuée de 94 % par rapport aux témoins : ainsi, elle est seulement de 140 µg dans les feuilles dépigmentées

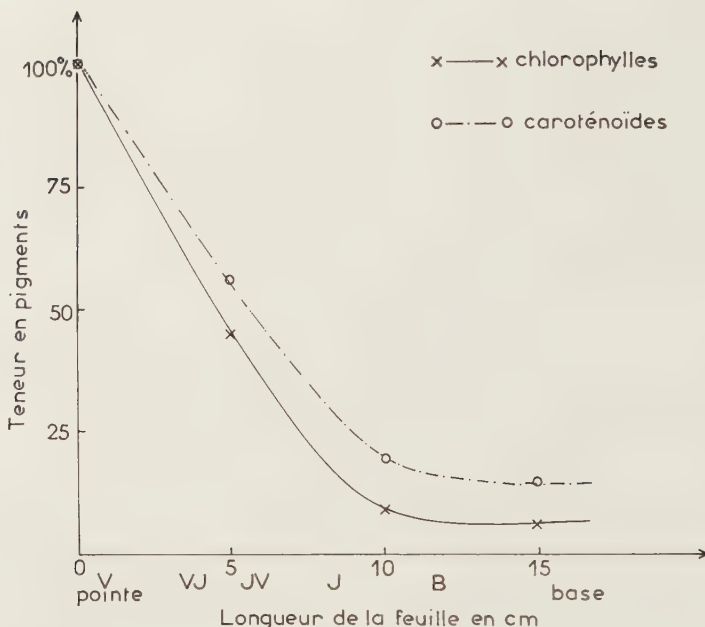


FIG. 3. — Teneurs en pigments des diverses parties de la 7^e feuille d'*Oryza sativa* L., 30 jours après le traitement par $1,2 \cdot 10^{-5}$ M d'AT.

Les teneurs en pigments sont exprimées en % par rapport à celles des régions correspondantes de la 7^e feuille de Riz témoin.

La pigmentation des diverses régions de la feuille est indiquée le long des abscisses. V, région verte ; VJ, vert-jaune ; JV, jaune-vert ; J, jaune ; B, blanche.

tandis que dans les feuilles vertes témoins, elle atteint $2\,340\ \mu\text{g}$. La teneur en chlorophylles totales, en pourcentage de la masse de substance sèche, montre une diminution de la même importance. On peut considérer que le rapport quantitatif entre chlorophylle *a* et chlorophylle *b* n'a pas changé.

La quantité de caroténoïdes des feuilles traitées est aussi très réduite par rapport aux témoins. De $34\ \mu\text{g}$ seulement pour les feuilles décolorées, elle s'élève à $300\ \mu\text{g}$ pour les feuilles normales, vertes. Toutefois, la diminution de la teneur en caroténoïdes est relativement un peu moins importante que celle de la teneur en chlorophylles et ne dépasse pas 85 %. Le fait que la synthèse des caroténoïdes semble être un peu moins inhibée par l'AT que celle des chlorophylles apparaît plus nettement encore en faisant le rapport chlorophylles totales/caroténoïdes : de 7,8 chez les feuilles témoins, ce rapport tombe à 4,1 chez les feuilles traitées.

Les feuilles ainsi blanchies par l'AT ne reverdissent jamais.

La séparation chromatographique, sur colonne de cellulose, des pigments liposolubles (LEFRANÇOIS, 1960), a permis d'identifier, dans les feuilles de Riz vertes témoins, par ordre d'élution, le β -carotène, la phéophytine *a* (qui provient probablement de la dégradation de la chlorophylle *a*), la lutéine, la violaxanthine impure, la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b*. Dans les feuilles de Riz entièrement décolorées par l'AT, les 2 chlorophylles et le β -carotène n'existent plus qu'en traces. Des 2 xanthophylles, seule, la lutéine reste en quantité appréciable et, fait nouveau, migrant

immédiatement après le β -carotène, apparaît un pigment rouge. Le tracé du spectre d'absorption de sa solution dans l'hexane et la position des maximums (445, 472, 504 $m\mu$, cf. fig. 4) permettent de penser qu'il s'agit du lycopène (KARRER et JUCKER, 1950). Un mélange de ce pigment avec du lycopène extrait de Tomate n'a pu être séparé par chromatographie sur colonne.

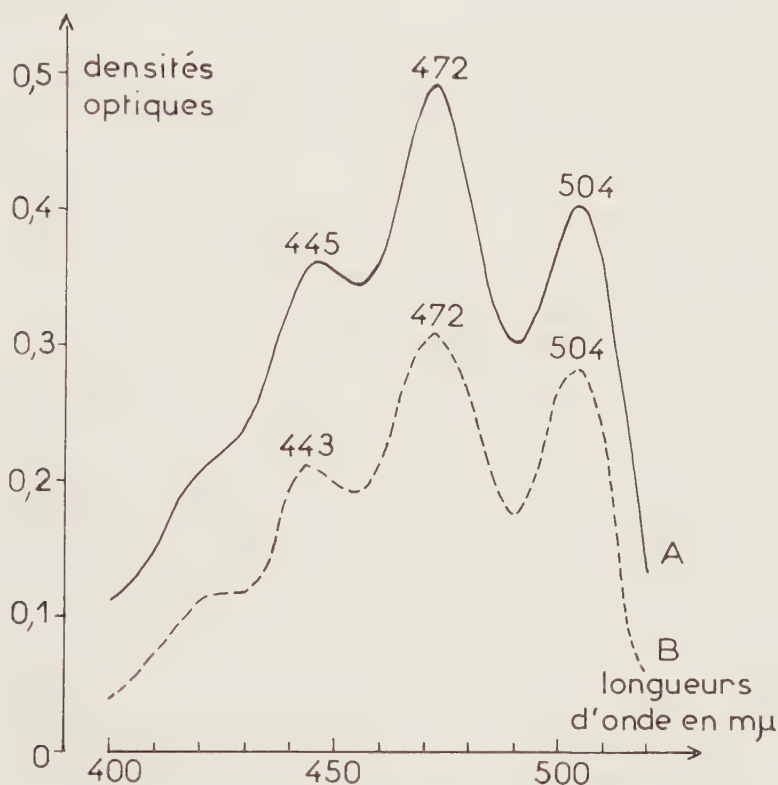


FIG. 4. — Spectre d'absorption d'une solution dans l'hexane du nouveau pigment apparu dans les feuilles d'*Oryza sativa* L., traitées par $1,2 \cdot 10^{-5}$ M d'AT (A).

Ce spectre correspond à celui du lycopène, dans l'hexane (B), d'après KARRER et JUCKER (1950).

D'après ces résultats, l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, provoque le blanchiment des feuilles de Riz, non pas par destruction des pigments mais plutôt par inhibition de la biosynthèse des chlorophylles et des caroténoïdes normalement présents dans les feuilles, en particulier du β -carotène. La synthèse des caroténoïdes est toutefois relativement moins inhibée que celle des chlorophylles. On assiste aussi à l'apparition d'un pigment nouveau du groupe du lycopène, remplaçant le β -carotène.

c) *Glucides solubles* : les glucides solubles ont été dosés dans les 8^e feuilles de Riz blanchies par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M. Les principaux résultats sont groupés dans le tableau III.

Les glucides réducteurs libres et le saccharose des feuilles traitées sont nettement diminués par rapport aux témoins ; en quantité, la diminution atteint 60 % ; elle ne dépasse pas 45 % en teneurs rapportées à la masse de substance sèche.

TABLEAU III

Variations des glucides réducteurs libres et du saccharose des 8^e feuilles d'Oryza sativa L., sous l'action de l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M.

Mêmes légendes que pour le tableau II

	8 ^e feuilles Tm		8 ^e feuilles AT	
	mg de glucose	% PS	mg de glucose	% PS
Glucides réducteurs libres	0,49	0,33	0,18	0,18
Saccharose	5,92	4,05	2,34	2,29

En résumé, les feuilles de Riz non pigmentées, sous l'action de l'AT, contiennent moitié moins de glucides réducteurs libres et de saccharose que les témoins.

B. Disparition de l'action inhibitrice de l'AT après remplacement du milieu additionné d'AT par du milieu neuf dépourvu d'AT

Après 30 jours de traitement par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, les plantes de Riz sont débarrassées de l'inhibiteur, puis cultivées à nouveau dans du milieu neuf sans AT.

Après l'apparition des 8^e feuilles entièrement décolorées, les 9^e feuilles formées montrent de nouveau, entre une pointe blanche et une base verte, une zone de transition dont la pigmentation varie du blanc au vert. Les 10^e feuilles retrouvent entièrement leur pigmentation normale et la même croissance en longueur que les témoins du même âge.

L'inhibition de la pigmentogenèse cesse donc avec l'interruption de l'apport de l'inhibiteur.

C. Discussion et conclusions

Les observations, effectuées sur les cultures d'*Oryza sativa* L., âgées de 2 mois, et traitées par l'AT, montrent que cette substance est un toxique puissant, car dès que la concentration en AT atteint $6 \cdot 10^{-5}$ M dans le milieu, la croissance terminale des plantes de Riz est considérablement ralentie pour être complètement bloquée à la concentration en AT de $1,2 \cdot 10^{-4}$ M. L'inhibition totale de la croissance est suivie de la dessiccation des organes préexistants, si la concentration en AT atteint $1,2 \cdot 10^{-3}$ M dans le milieu. MINTON, PRESTON et ORGELL (1958) ont obtenu des résultats comparables avec les plantes de Haricot, mais les concentrations léthales d'AT y sont 10 à 100 fois plus fortes (de 10^{-2} à 10^{-1} M). Cette différence semble dépendre de l'espèce considérée ou du mode de traitement des plantes, car ils ont procédé par application foliaire.

Le seuil d'action de l'AT sur le Riz est à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M. A cette concentration, le rythme d'apparition des jeunes feuilles est presque normal. Cependant, celles-ci sont légèrement plus courtes que les témoins. L'examen au microscope, des cellules épidermiques de ces feuilles, suggère que l'AT a réduit leur nombre plutôt que leur longueur. Cette hypothèse est conforme aux résultats concernant le blocage des divisions cellulaires par l'AT, obtenus par SRIVASTAVA (1959) avec des racines de Pois, et par d'autres auteurs avec divers microorganismes photosynthétiques, AARONSON et SCHER (1960) avec *Ochromonas danica* en particulier, CASTELFRANCO

et BISALPUTRA (1965) avec *Scenedesmus quadricauda* et GUÉRIN-DUMARTRAIT (1966) avec *Chlorella pyrenoidosa*.

Les feuilles de Riz, formées en présence d'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M dans le milieu, restent bien turgescents ; leur teneur en eau a même augmenté légèrement par rapport aux témoins. GUILLOT-SALOMON, SIGNOL et DOUCE (1966) ont aussi remarqué, chez le Maïs, cette hydratation plus élevée des tissus foliaires traités par l'AT.

Par contre, sous l'action de l'AT, les feuilles de Riz présentent une diminution de la production du matériel végétal, traduite par une baisse de 30 % du poids de substance sèche. Cette diminution est due, en partie, à une réduction de la synthèse apparente des protéines (bilan des synthèses et des dégradations) d'environ 60 % par rapport aux témoins. L'inhibition de la protéogenèse par l'AT a été constatée de même avec des germinations de Maïs (McWHORTER, 1963 ; GUILLOT-SALOMON et al., 1966), de Blé (BARTELS et WOLF, 1965), et avec des Chlorelles (GUÉRIN-DUMARTRAIT, 1966).

Le dosage des glucides solubles indique aussi une réduction de 50 % environ dans la teneur en glucides réducteurs et en saccharose des feuilles de Riz traitées par l'AT. Un fait analogue a déjà été signalé par HALL, JOHNSON et LEINWEBER (1954), dans les organes aériens de plants de Coton traités par l'AT. Il est à rapprocher des observations de GUÉRIN-DUMARTRAIT (1966) selon lesquelles la vitesse d'incorporation du ^{14}C dans les glucides solubles et en particulier dans le saccharose, par des Chlorelles traitées par l'AT, est réduite de 95 % environ.

Enfin, l'AT inhibe très fortement la synthèse des pigments. Les feuilles de Riz, apparues en présence d'AT, de couleur blanc-jaune, sont pratiquement dépourvues de pigments. Ainsi, leur teneur en chlorophylles et en caroténoïdes ne représente plus que 6 % et 15 % respectivement de celle des témoins. L'inhibition de la synthèse de caroténoïdes est un peu moins forte que celle de la synthèse des chlorophylles. Ces phénomènes sont très généraux. La dépigmentation complète des feuilles a été observée chez diverses plantes supérieures par de nombreux auteurs, en particulier, HEIM, APPLEMAN et PYFROM (1956), PYFROM et al. (1957) avec de jeunes plantes de Tournesol ou d'Orge, et des plants de Pomme de Terre, WOLF (1960) avec de jeunes plantes de Blé, McWHORTER et PORTER (1960), McWHORTER (1963), SIGNOL (1965) avec de jeunes plantes de Maïs.

Les tissus parfaitement décolorés par l'AT le sont définitivement et ne reverdisent jamais. Les modifications pigmentaires n'intéressent que les régions en cours de différenciation au moment de l'action du toxique. L'AT, en effet, ne détruit pas la pigmentation des organes verts existants avant le traitement, de même qu'il n'empêche pas la chlorophyllogénèse de ceux se formant après son action.

Sous l'effet de l'AT, les synthèses des chlorophylles *a* et *b* sont bloquées rapidement, et un pigment nouveau du groupe du lycopène s'accumule à la place du β -carotène. SIGNOL (1965) a obtenu des résultats comparables, en traitant de jeunes plantes de Maïs par l'AT, ou par un autre inhibiteur, l'acide 3-(α -iminoéthyl)-5-méthyltétronique. Par ailleurs, l'accumulation de lycopène a été remarquée chez un mutant de *Chlorella* par CLAES (1956) et dans les feuilles de mutants de Tomate Xantha et Albina par LEFORT (1959). Il semble que ce pigment, qui ne s'accumule pas dans les conditions normales, peut apparaître en grande quantité, à la suite d'une inhibition ou d'une mutation.

La microscopie électronique (BARTELS, 1965 ; GUILLOT-SALOMON, 1966) a montré que, dans les chloroplastes des tissus dépigmentés de jeunes plantes de

Blé ou de Maïs traitées par l'AT, le système lamellaire est très désorganisé, presque inexistant. Si l'on admet avec LEFORT (1959) la nécessité des pigments chlorophylliens dans le phénomène de l'organisation lamellaire, l'inhibition du développement intramembranaire des chloroplastes pourrait être due à un effet direct de l'AT sur la synthèse de ces pigments. L'action inhibitrice de l'AT serait alors due soit à un mécanisme de compétition du fait de l'analogie de structure de l'AT avec celle du noyau pyrrol (HALL et *al.*, 1954 ; PASTAC, 1959), soit à un blocage à un point quelconque des séries de réactions de synthèse conduisant à la formation des chlorophylles. Jusqu'à présent, ces hypothèses d'une action *directe* de l'AT sur la synthèse des pigments chlorophylliens n'ont pas reçu de preuves expérimentales.

Il paraît plausible aussi de penser que l'AT, en inhibant la synthèse des acides ribonucléiques (SCHWEIZER et ROGERS, 1964 ; BARTELS et WOLF, 1965 ; GUÉRIN-DUMARTRAIT, 1966), du phosphatidylglycérol, des galactolipides et sulfolipides (GUILLOT-SALOMON et *al.*, 1966) et en ralentissant la vitesse des synthèses protéiques, pourrait être à l'origine d'un arrêt du développement des chloroplastes (SHIBUYA et HASE, 1965 ; AOKI et HASE, 1964) entraînant ainsi une inhibition de la pigmentogénèse.

II. MÉTABOLISME DES FEUILLES D'*ORYZA SATIVA* L. FORMÉES EN PRÉSENCE D'AT

Considérant toutes les modifications produites par l'AT dans la composition des feuilles de Riz ainsi que dans leur croissance, il a paru intéressant d'étudier quelques propriétés fonctionnelles de ces feuilles.

A. Echanges gazeux respiratoires et photosynthétiques

Les intensités respiratoires (IR) et photosynthétiques (IP) des 8^e feuilles de Riz, dépigmentées par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, sont déterminées. Les principaux résultats sont réunis dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Intensités respiratoires et photosynthétiques des 8^e feuilles d'Oryza sativa L., blanchies par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, et de feuilles témoins (Tm).

Intensités respiratoires (IR) et photosynthétiques (IP), en μ l d'O₂ absorbé ou émis (compte tenu de la respiration) par heure (Température = 25 °C ; éclaircissement : 2 000 lux).

IRf et IPf = en μ l d'O₂ absorbé ou émis par feuille et par heure.

IRs et IPs = en μ l d'O₂ absorbé ou émis pour 1 g de substance sèche et par heure.

IRNp et IPNp = en μ l d'O₂ absorbé ou émis par mg d'N protéique et par heure.

IP Chl = en μ l d'O₂ émis par mg de chlorophylle présente et par heure.

TChl = teneur en chlorophylles, en mg/g de substance sèche.

8 ^e feuilles	IR			IP				T Chl
	IRf	IRs	IRNp	IPf	IPs	IPNp	IPChl	
Tm	9	1 064	30	17	2 153	61	169	12,7
AT	10	1 901	79	2	456	19	507	0,9

L'IR des feuilles blanchies par l'AT, exprimée par feuille, n'a pratiquement pas changé par rapport à celle des témoins. Par contre, elle présente, exprimée par unité de substance sèche, une nette exaltation, laquelle atteint 80 % environ. L'augmentation de l'IR est encore plus importante, si celle-ci est exprimée par unité de protéines ; l'IR des feuilles traitées par l'AT est alors multipliée par 2,5 par rapport aux témoins.

L'IP par feuille, dans les conditions suboptimales d'illumination décrites, est diminuée de 85 à 90 %. Par unité de substance sèche ou par unité de protéines, elle subit une diminution relativement moins forte, soit de 70 à 80 %. Exprimée par unité de chlorophylle, l'IP des feuilles blanchies par l'AT est, par contre, triple de celle des feuilles vertes témoins.

L'AT provoque ainsi, dans les tissus foliaires de Riz, une nette augmentation des échanges gazeux respiratoires, due, semble-t-il, à une plus grande activité du protoplasme. L'activité photosynthétique, par contre, se trouve très réduite. Le fait que l'IP des feuilles dépigmentées, par unité de chlorophylle, est triple de celle des feuilles vertes, peut s'expliquer par les conditions de lumière non saturante où sont faites les mesures ; par ailleurs, il montre que la chlorophylle résiduelle reste encore active et que la non-pigmentation des feuilles est le facteur limitant essentiel de la photosynthèse. En première approximation, les réactions sombres doivent être moins réduites dans leur vitesse globale que ne le sont les réactions photochimiques.

B. Incorporation du ^{32}P à l'obscurité et à la lumière

Les limbes des 8^e feuilles de Riz, dépigmentées par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, sont coupés au ras de la gaine, sur une longueur de 12 cm. Ils reçoivent alors le ^{32}P par infiltration sous vide, à l'obscurité, pendant 3 fois 1 mn, d'une solution de $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$ (4 000 μC , dans 200 ml d'eau, ajustés à pH 6 à l'aide de CO_3K_2 $5 \cdot 10^{-1}$ M). Après des lavages répétés dans l'eau, ils sont disposés dans une enceinte humide, et illuminés à 5 000 lx. La température est de 25 °C. Après 1, 5, 15 et 30 mn d'illumination à 5 000 lx, les limbes sont fixés par projection dans du méthanol bouillant. Chaque lot comprend 100 fragments de la base des limbes (NGUYEN-THI, 1961).

Dans une autre expérience, au lieu d'être illuminés à 5 000 lx pendant des temps différents, les limbes sont laissés à l'obscurité pendant 5 mn pour un lot, et illuminés à 1 000 et 5 000 lx pendant 5 mn aussi pour les 2 autres lots. La température est toujours de 25 °C.

Les résultats des analyses sont présentés dans les tableaux V et VI. Les radioactivités des substances solubles, extraites et séparées, sont exprimées en nombre d'impulsions par minute et par gramme de substance foliaire sèche, ou en pourcentage de la radioactivité fixée dans la fraction soluble organique. L'examen des tableaux V et VI permet de constater les faits suivants :

— Après 5 mn d'obscurité, la radioactivité totale des composés organiques est plus élevée dans les feuilles dépigmentées que dans les feuilles vertes. L'élévation de la radioactivité par rapport aux témoins diminue d'importance avec la lumière et la durée de l'éclairement et disparaît ainsi après 15 mn d'illumination.

— A l'obscurité comme à la lumière (1 000 et 5 000 lx), les oses-diphosphates extraits des limbes traités possèdent environ 2 à 3 fois plus de radiophosphate que ceux extraits des limbes témoins.

— L'incorporation du ^{32}P dans les glucose-monophosphates est environ

1,5 à 2 fois plus élevée dans les feuilles chlorotiques que dans les témoins, indépendamment de l'intensité lumineuse et de la durée d'illumination. L'augmentation de la radioactivité par rapport aux témoins est la moins nette pour le fructose-6-phosphate.

— Les variations des acides organiques phosphorylés sont très différentes. Après 5 mn d'obscurité, la somme PGA + PEP des feuilles vertes représente 15 %

TABLEAU V

Incorporation de ^{32}P , à la lumière, par les 8^e feuilles d'Oryza sativa L., blanchies par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, et par des feuilles témoins (Tm), en fonction du temps.

Conditions de l'expérience : infiltration sous vide, à l'obscurité, pendant 3 fois 1 mn, d'une solution de $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$ (radioactivité : 4 000 μC ; radioactivité spécifique : 20 $\mu\text{C}/\text{ml}$) ajustée à pH 6 avec CO_3K_2 $5 \cdot 10^{-1}$ M.

Eclairement 5 000 lux ; température : 25 °C.

Radioactivité acquise (Rad) en milliers d'impulsions par mn et par g de substance sèche dans la fraction soluble totale et dans les deux fractions de l'extrait soluble. Répartition en pourcentages de la radioactivité de la fraction soluble totale.

Radioactivité acquise en milliers d'impulsions par mn et par g de substance sèche dans les différents métabolites. Répartition en pourcentages de la radioactivité de la fraction soluble organique.

		Durée d'éclairement après infiltration de ^{32}P							
		1 mn		5 mn		15 mn		30 mn	
		Tm	AT	Tm	AT	Tm	AT	Tm	AT
Extrait soluble (somme)	Rad	1 575	1 501	1 584	1 544	1 547	1 559	1 571	1 503
Fraction « phosphate inorganique »	Rad	1 280	1 159	1 260	1 195	1 220	1 218	1 160	1 090
	%	81,5	77,2	79,6	77,5	78,8	78,2	74	72,5
Fraction « phosphate organique » totale	Rad	295	343	324	349	327	341	411	413
	%	18,8	22,8	20,4	22,5	21,2	21,8	26	27,5
Oses-diphosphates	Rad	22	67	23	84	21	43	38	73
	%	7,4	19,6	7,1	24,1	6,4	14,1	9,2	17,7
Adénosine-triphosphate	Rad	58	99	52	58	50	65	73	81
	%	19,7	29,1	16,1	16,6	15,2	19	17,8	19,6
Adénosine-diphosphate	Rad	20	25	14	33	14	34	14	33
	%	6,8	7,2	4,3	9,5	4,3	10	3,4	8
Fructose-6-phosphate	Rad	55	45	44	61	58	60	57	50
	%	18,7	13,1	13,6	17,5	17,7	17,6	13,9	12,1
Glucose-phosphates	Rad	51	85	56	91	52	110	70	141
	%	17,3	24,8	17,3	26,9	15,9	32,2	17	34,2
Acide phosphoglycérique	Rad	50	21	97	22	108	24	127	35
	%	17,2	6,1	30	6,3	33	7	30,9	8,5
Acide phosphoénolpyruvique	Rad	26	traces	19	traces	12	traces	32	traces
	%	8,8		5,9		3,7		7,8	
Substances non déterminées	Rad	13	traces	19	traces	12	traces	traces	traces
	%	4,4		5,9		3,7			

TABLEAU VI

Incorporation de ^{32}P par les 8^e feuilles d'*Oryza sativa* L., blanchies par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M et exposées à l'obscurité ou à différents éclairagements, pendant 5 mn, et par les feuilles témoins (Tm) dans les mêmes conditions

Légendes et conditions de l'expérience : voir tableau V.

		Obscurité		Lumière			
				1 000 lux		5 000 lux	
		Tm	AT	Tm	AT	Tm	AT
Extrait soluble (somme)	Rad	1 495	1 490	1 505	1 493	1 506	1 510
Fraction « phosphate inorganique »	Rad %	1 288 86,1	1 120 75,2	1 210 80,3	1 128 75,5	1 201 79,4	1 149 76,2
Fraction « phosphate organique » totale	Rad %	207 13,9	370 24,8	295 19,7	365 24,5	305 20,6	361 23,8
Oses-diphosphates	Rad %	20 9,7	78 21	24 8,1	77 21,1	17 5,6	76 21
Adénosine-triphosphate	Rad %	61 29,5	104 28,1	59 20	89 24,4	53 17,4	79 21,8
Adénosine-diphosphate	Rad %	19 9,2	31 8,4	18 6,1	30 8,2	17 5,6	33 9,1
Fructose-6-phosphate	Rad %	42 20,4	52 14	37 12,5	54 14,8	39 12,8	55 15,2
Glucose-phosphates	Rad %	34 16,2	77 20,8	55 18,6	88 24,1	48 15,7	86 23,8
Acide phosphoglycérique	Rad %	31 15,1	28 7,6	91 30,8	27 7,4	118 38,7	32 8,9
Acide phosphoénolpyruvique	Rad %	traces	traces	11 7,6	traces	13 4,3	traces

environ de la radioactivité fixée dans la fraction soluble organique ; celle des feuilles non pigmentées n'en représente que 8 %. A la lumière, dans les feuilles vertes, la radioactivité du PGA augmente avec l'intensité lumineuse et la durée d'éclairement ; elle devient ainsi facilement le triple ou le quadruple de celle observée à l'obscurité, ou seulement après 1 mn d'illumination. Par contre, la radioactivité du PGA des feuilles blanchies reste stationnaire ; la différence de radioactivité par rapport aux témoins est alors considérable. De même, la radioactivité du PEP n'existe plus qu'à l'état de traces dans les feuilles blanchies, alors qu'elle est appréciable dans les feuilles vertes.

— Quelles que soient les conditions d'expérience (durée, lumière et obscurité), les adénosine-phosphates sont toujours nettement plus marqués, en valeur absolue, dans les limbes traités que dans les témoins. Pour l'ATP, l'élévation de radioactivité est assez remarquable, après 5 mn d'obscurité ou 1 mn d'éclairement. Cependant, elle semble diminuer d'importance avec la lumière et la durée d'éclairement. Par

contre, pour l'ADP, l'augmentation de radioactivité par rapport aux témoins, assez faible après 5 mn d'obscurité ou 1 mn d'éclairement, croît rapidement avec la lumière et ne change pas avec la durée d'illumination. Le traitement par l'AT provoque une modification sensible de l'évolution du rapport ADP radioactif/ATP radioactif. Pour les temps courts, aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière, chez les témoins comme chez les traités, ce rapport est voisin de 0,3. Lorsqu'on prolonge l'éclairement, il diminue et tend vers 0,2 chez les témoins alors qu'il augmente et tend vers 0,5 chez les feuilles dépigmentées.

En résumé, dans les feuilles de Riz, dépigmentées par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, deux faits s'opposent : la faible radioactivité des acides organiques phosphorylés, surtout à la lumière, et l'intense incorporation du ^{32}P dans les oses diphosphates, les hexoses monophosphates et les adénosine-phosphates. L'augmentation de radioactivité de l'ATP des feuilles traitées, tend cependant à s'effacer avec la durée d'éclairement.

C. Discussion et conclusions

La mesure des échanges gazeux montre que l'activité respiratoire des feuilles de Riz blanchies par l'AT est presque le double de celle des témoins. L'exaltation de la respiration, sous l'action de l'AT, a été signalée dans les tissus foliaires de Coton (HALL et *al.*, 1954) et de Maïs (McWHORTER, 1963) ainsi que chez les Chlorelles (GUÉRIN-DUMARTRAIT, 1966).

L'activité photosynthétique des feuilles dépigmentées est, par contre, très réduite. Le fait que la teneur en glucides réducteurs et en saccharose de ces feuilles est diminuée de 50 % par rapport aux témoins (voir Résultats, paragraphe IA 2c) pourrait trouver son explication à la fois dans cette exaltation de l'intensité respiratoire et dans cette diminution de l'intensité photosynthétique.

Ces feuilles ne sont cependant pas complètement inactives : les chlorophylles résiduelles qu'elles renferment les rendent encore capables d'une émission photosynthétique d' O_2 . Dans le même ordre d'idées, GUÉRIN-DUMARTRAIT (1966) a obtenu, en 30 mn d'illumination, avec des Chlorelles partiellement dépigmentées par l'AT, une fixation photosynthétique de $^{14}\text{CO}_2$ qui représente encore 40 % de la quantité de ^{14}C fixée par les témoins.

Si l'on infiltre du ^{32}P aux feuilles de Riz dépigmentées par l'AT, on peut constater qu'après 5 mn d'obscurité, la proportion de radiophosphate fixée dans le PGA est plus faible que celle des témoins (en valeur relative). Au contraire, le marquage des hexoses-monophosphates et surtout des oses-diphosphates dépasse largement celui des témoins, en valeur absolue comme en valeur relative. L'ensemble de ces faits suggère une inhibition dans la formation du PGA par voie obscure, non photosynthétique, qui pourrait être due à une réduction de l'activité aldolase. Cette hypothèse est en accord avec les observations de McWHORTER et PORTER (1960) selon lesquelles des homogénats de tissus foliaires de Maïs, chlorotiques par action de l'AT, ont une capacité de clivage du fructose-diphosphate en trioses-phosphates diminuée de moitié par rapport à celle des témoins.

La faible radioactivité du PGA des feuilles traitées, après 5 mn d'obscurité, pourrait être due en partie aussi à une activation des mécanismes d'utilisation du PGA engagé dans le métabolisme oxydatif. Le fait que les feuilles blanchies par l'AT ont une intensité respiratoire nettement exaltée rend cette éventualité probable.

Après 5 mn à 5 000 lx, le marquage du PGA, dans les feuilles vertes, a plus

que triplé par rapport à celui obtenu après 5 mn d'obscurité. Cette augmentation de radioactivité du PGA témoignerait du déroulement du cycle de CALVIN. Au contraire, dans les feuilles non pigmentées, la radioactivité du PGA est restée stationnaire. On est conduit à penser à une inhibition dans la genèse du PGA par voie photosynthétique. La diminution de la vitesse de fixation du CO_2 par le RuDP peut être due à un ralentissement de la réaction de carboxylation elle-même, ou bien à une réduction de la vitesse de régénération de l'accepteur de CO_2 . Les résultats obtenus jusqu'à présent ne permettent pas encore de choisir entre ces possibilités.

La radioactivité des adénosine-phosphates des limbes traités est toujours nettement plus élevée (en valeur absolue) que celle des limbes témoins. Comme l'incorporation du ^{32}P dans les nucléotides de l'adénine se fait à partir des nucléotides présents, les valeurs obtenues ne peuvent nous renseigner que sur la mobilité des radicaux phosphorylés de ces nucléotides. Le traitement par l'AT, augmentant à la fois la radioactivité de l'ADP et de l'ATP, semble provoquer une plus grande mobilité des deux phosphoryles terminaux de l'ATP. En particulier, l'évolution du rapport ADP radioactif/ATP radioactif montre que cette action du toxique est singulièrement accentuée sur le « 2^e groupe phosphate », lorsque l'on compare cette évolution à celle des feuilles témoins éclairées.

III. ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DES FEUILLES D'*ORYZA SATIVA* L. BLANCHIES PAR L'AT

Ainsi qu'il a été vu dans le paragraphe précédent, dans les feuilles de Riz blanchies par l'AT, la formation de PGA par voie photosynthétique est nulle ou très faible. Dans la réaction



le facteur limitant peut provenir, soit de l'absence de régénération du RuDP, accepteur de CO_2 , soit de la perte d'activité ou du manque de synthèse de l'enzyme responsable. L'étude de l'activité RuDP-carboxylase est donc particulièrement intéressante.

D'autre part, l'étude de l'activité des deux enzymes, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase a été entreprise afin de voir si l'exaltation de la respiration des feuilles blanchies n'est pas en relation avec une augmentation d'activité de ces deux enzymes.

A. Activité ribulose-diphosphate carboxylase

La localisation de la RuDP-carboxylase dans les chloroplastes est un fait bien connu. Cependant, lors de l'isolement des chloroplastes en milieu aqueux, cette enzyme, qui est soluble dans l'eau, peut diffuser en partie dans le milieu d'extraction. L'activité RuDP-carboxylase, de la fraction chloroplastique seule, risque donc d'être très inférieure à celle des feuilles entières ; pour cette raison, on a choisi d'opérer avec des broyats de feuilles simplement débarrassés des gros débris cellulaires.

Les expériences ont été réalisées avec des broyats de feuilles n° 8 d'*Oryza sativa* L., soit vertes normalement, soit blanchies par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M. Dans le premier cas, des mesures ont été faites également en présence d'AT ajouté au milieu réactionnel aux concentrations finales de 10^{-3} M et 10^{-2} M.

L'ensemble des résultats obtenus (tableau VII) met en évidence les faits suivants.

a) En absence de RuDP exogène, la fixation du $^{14}\text{CO}_2$ par les broyats de feuilles témoins ou traitées n'est pas très importante. Néanmoins, la radioactivité du broyat de feuilles dépigmentées arrive à être environ 2,5 fois plus élevée que celle du broyat de feuilles vertes. Dans les deux cas, la totalité du ^{14}C fixé se retrouve presque exclusivement dans l'acide aspartique.

TABLEAU VII

Incorporation du $^{14}\text{CO}_2$, en absence ou en présence de RuDP exogène, par les broyats de 8^e feuilles d'Oryza sativa L. blanchies par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M et par les broyats des feuilles vertes témoins, en absence ou en présence d'AT.

Tm : broyats de feuilles vertes

AT : broyats de feuilles blanchies par l'AT.

Tm+AT à 10^{-3} M ou 10^{-2} M : l'AT est ajouté au moment de la fixation jusqu'aux concentrations indiquées.

Température : 22 °C ; lumière ambiante (500 lx).

Composition du milieu réactionnel : voir texte (Méthodes et techniques, paragraphe G 1).

Durée de fixation : 10 mn.

Radioactivité acquise (Rad) en milliers d'impulsions par mn et par mg d'N protéique dans l'extrait soluble et dans les principaux métabolites.

Répartition en pourcentages de la radioactivité de la fraction soluble.

		Répartition dans l'extrait soluble										
		extrait soluble	Ac. aspar- tique		Sérine + glycocolle		α -alanine		Ac. phos- phogly- cérique		Indéterminé	
		Rad. (som- me)	rad.	%	rad.	%	rad.	%	rad.	%	rad.	%
Tm	Sans RuDP exogène	1,4	1,4	99	traces						traces	
	Avec RuDP exogène	19	7,4	39	1,5	7,9	5,4	28,5	4,6	24,2	0,1	0,5
Tm+AT à 10 ⁻³ M . .	Sans RuDP exogène	1,5	1,5	99	traces						traces	
	Avec RuDP exogène	18	6,8	37,8	1,2	6,7	5,6	31,2	4,3	23,8	0,1	0,5
Tm+AT à 10 ⁻² M . .	Sans RuDP exogène	1,3	1,3	99	traces						traces	
	Avec RuDP exogène	21	8	38	1,6	7,6	6,2	29,5	5,1	24,3	0,1	0,5
AT	Sans RuDP exogène	3,6	3,6	99	traces						traces	
	Avec RuDP exogène	8,6	3,5	40,6	1,2	13,9	0,6	6,9	3	34,8	0,3	0,3

b) En présence de RuDP exogène, la radioactivité totale fixée par le broyat de feuilles vertes augmente de façon très importante (12 à 16 fois), même si l'AT est ajouté au milieu réactionnel aux concentrations de 10^{-3} M et 10^{-2} M. Le broyat de feuilles dépigmentées est loin d'être aussi actif : la fixation de $^{14}\text{CO}_2$ n'est que le double environ de celle constatée en absence de RuDP exogène, ce qui ne représente que 45 % de celle obtenue avec le broyat de feuilles vertes.

— L'examen de la répartition de la radioactivité, dans les principaux métabolites de l'extrait soluble, montre que, dans le broyat des feuilles vertes, l'acide aspartique est 5 fois plus radioactif en présence de RuDP exogène qu'en absence du substrat. On constate, en plus, un marquage du PGA, de l' α -alanine et du groupe sérine + glycocolle.

— Si l'AT est ajouté au milieu réactionnel aux concentrations de 10^{-3} M et 10^{-2} M, la répartition de la radioactivité n'a pratiquement pas changé par rapport aux témoins.

— Dans le cas du broyat de feuilles blanchies, en présence de RuDP exogène, l'acide aspartique n'est pas plus radioactif qu'en absence du substrat. On peut noter cependant la formation du PGA, d' α -alanine et du groupe sérine + glycocolle radioactifs. Seulement, le marquage du PGA et du groupe sérine + glycocolle est réduit de 20 à 35 % par rapport aux témoins et celui de l' α -alanine a subi une très forte diminution (90 %).

Discussion et conclusions

La radioactivité du PGA, de l' α -alanine et du groupe sérine + glycocolle est en relation directe avec la carboxylation du RuDP exogène. Puisque la synthèse de l'acide aspartique se fait par amination de l'acide oxaloacétique dont la radioactivité est assurée en partie par la carboxylation du RuDP et en partie par la β -carboxylation du phosphoénolpyruvate provenant du PGA formé par la 1^{re} carboxylation (CHAMPIGNY, 1960), on peut considérer que la carboxylation du RuDP est responsable aussi du tiers de la radioactivité acquise par l'acide aspartique. En y joignant la somme des radioactivités fixées dans le PGA, l' α -alanine et le groupe sérine + glycocolle, on obtient donc l'activité RuDP-carboxylase. *Dans les feuilles de Riz blanchies, cette activité est environ 2,5 fois moins importante que celle des témoins.*

Si on rapproche ces résultats de ceux obtenus, lorsque l'AT est ajouté au milieu réactionnel aux concentrations finales de 10^{-3} M et 10^{-2} M, il apparaît que la faible activité RuDP-carboxylase des feuilles de Riz blanchies par l'AT n'est pas due à une inactivation de l'enzyme préexistante mais qu'elle serait plutôt liée à une inhibition de la synthèse de l'enzyme fonctionnelle.

Etant établi que l'AT provoque un arrêt du développement normal des chloroplastes (BARTELS, 1965 ; GUILLOT-SALOMON, 1966), il est très possible que, dans ces chloroplastes non développés, la synthèse de la RuDP-carboxylase, enzyme chloroplastique, soit perturbée. Cette supposition rejoint alors les conclusions de FULLER et GIBBS (1959) ; pour ces auteurs, l'enzyme catalysant la carboxylation du RuDP est liée essentiellement aux chloroplastes et dès que l'appareil photosynthétique est touché, soit par étiolement, soit par mutation, la formation enzymatique du PGA à partir du RuDP et de CO_2 est inhibée.

Le fait qu'en absence de RuDP exogène, le broyat de feuilles dépigmentées fixe environ 2 fois plus de $^{14}\text{CO}_2$ que le broyat de feuilles vertes, pourrait être l'indice d'une accumulation de RuDP endogène dans ces feuilles.

La faible radioactivité à la fois de l'acide aspartique et de l' α -alanine des feuilles blanchies par rapport aux témoins suggère une inhibition dans la formation du phosphoénolpyruvate à partir du PGA, mais ce point demanderait à être vérifié.

B. Activités glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase

Bien que les enzymes oxydant le glucose-6-phosphate aient été localisées dans la fraction dite cytoplasmique des extraits aqueux de feuilles de plantes supérieures, par différents auteurs, AXELROD, BANDURSKI, GREINER et JANG (1953) dans l'Epinard et le Pois, BRANDON (1963) dans le *Bryophyllum tubiflorum* Harv, d'autres chercheurs ont cependant montré la présence de ces deux enzymes dans les chloroplastes, ARNON (1958) avec les chloroplastes d'Epinard isolés en milieu aqueux, GARNIER-DARDART (1965) avec les chloroplastes de *Bryophyllum daigremontianum* Berger isolés en milieu organique. Il a donc paru préférable aussi d'opérer avec des homogénats de feuilles, obtenus en milieux aqueux et simplement débarrassés des gros débris et parois cellulaires, pour pouvoir mesurer une activité de ces deux enzymes qui soit la plus représentative possible de celle des feuilles entières.

Les broyats ont été réalisés avec des feuilles n° 8 d'*Oryza sativa* L., formées en présence d'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, donc dépigmentées. Les activités enzymatiques obtenues sont exprimées en μ M de NADP réduit (coefficient d'extinction de NADPH₂ à 340 m μ = 6,45 μ M/cm³) par mg d'N protéique du broyat foliaire.

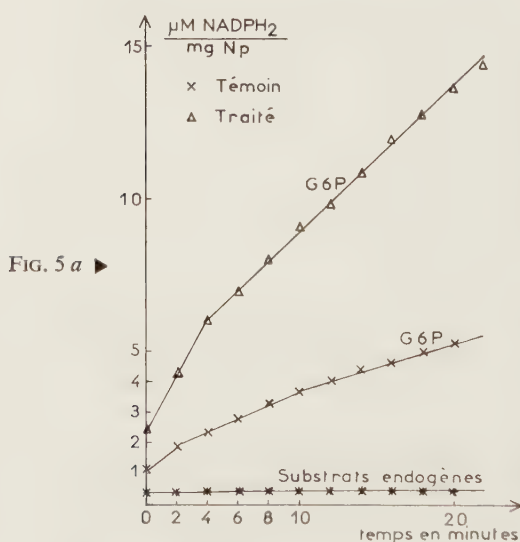
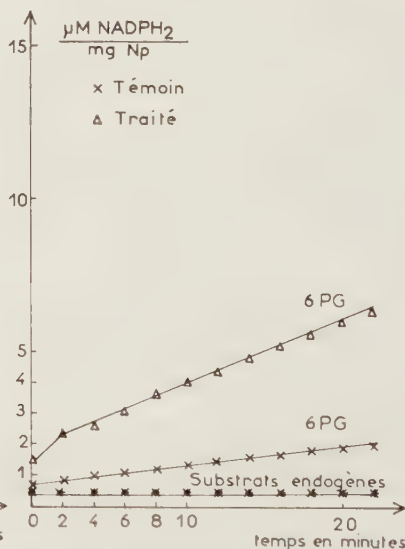


FIG. 5a ►



◄ FIG. 5b

Fig. 5a. - Réduction du NADP en présence de glucose-6-phosphate (G-6-P) par les broyats de feuilles d'*Oryza sativa* L.

Température : 27 °C.

Composition du milieu réactionnel : voir texte (Méthodes et techniques, paragraphe G2).

Fig. 5b. - Réduction du NADP en présence de 6-phosphogluconate (6-PG) par les broyats de feuilles d'*Oryza sativa* L.

Température : 27 °C.

Composition du milieu réactionnel : voir texte (Méthodes et techniques, paragraphe G2).

Les résultats, illustrés par les figures 5a et 5b, confirment la présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase et de 6-phosphogluconate déshydrogénase dans les feuilles de Riz. Ils montrent aussi les faits suivants :

— La réduction du NADP par le broyat de feuilles de Riz vertes est environ 3 fois plus faible en présence de 6-phosphogluconate qu'en présence de glucose-6-phosphate ; en 10 mn, avec le 6-phosphogluconate (6-PG) comme substrat, $1,3 \mu\text{M}$ de NADP a été réduite ; par contre, avec le glucose-6-phosphate (G-6P), $3,7 \mu\text{M}$ de NADPH₂ ont été formées. Dans les feuilles blanchies par l'AT, le rapport G-6P déshydrogénase/6-PG déshydrogénase n'est plus que de 2 (9/4 en 10 mn).

Mais ce qui est plus frappant, c'est l'augmentation des activités après traitement par l'AT.

— En présence de glucose-6-phosphate, la formation de NADPH₂ est environ 2,5 fois plus importante, quand on opère avec des broyats obtenus à partir de feuilles de Riz dépigmentées par l'AT ; l'activité G-6P déshydrogénase est, en moyenne, de $48 \mu\text{M/h/mg}$ d'N protéique. Dans le broyat de feuilles de Riz vertes, normales, elle est seulement de $19 \mu\text{M/h/mg}$ d'N protéique.

— En présence de 6-phosphogluconate, les mêmes faits se reproduisent, un peu plus accentués encore. Dans le broyat de feuilles traitées, l'activité 6-PG déshydrogénase est, en moyenne, de $21 \mu\text{M/h/mg}$ d'N protéique, alors qu'elle atteint à peine $7 \mu\text{M/h/mg}$ d'N protéique, dans le broyat de feuilles témoins.

Les activités des deux enzymes glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase sont donc 2 à 3 fois plus élevées dans les feuilles de Riz dépigmentées par l'AT.

Discussion et conclusions

L'exaltation dans les organes traités des activités des deux enzymes glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase explique au moins en partie l'exaltation de leur intensité respiratoire. Par ailleurs, elle suggère nettement une augmentation d'activité de la voie des pentoses-phosphates dans les feuilles de Riz dépigmentées par l'AT, d'autant plus qu'on a constaté, dans ces feuilles, à l'obscurité, une accumulation des hexoses-phosphates et surtout des oses-diphosphates, au détriment du PGA. Cette accumulation pourrait être le signe d'une inhibition possible au niveau de l'aldolase. Il est possible également que la voie d'oxydation directe du glucose soit plus active.

L'exaltation dans les feuilles traitées des activités des deux enzymes glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase serait à rapprocher des observations de GUILLOT-SALOMON (1966) selon lesquelles les ribosomes cytoplasmiques semblent augmenter considérablement en nombre et en densité dans les feuilles de Maïs blanchies par l'AT.

Selon BLACK et HUMPHREYS (1962), les jeunes plantes de Pois traitées par l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2-4 D) présentent aussi une augmentation d'activité de la G-6-P déshydrogénase et de la 6-PG déshydrogénase et une diminution d'activité de la fructoaldolase. A ce point de vue, on pourrait conclure à une analogie d'action entre l'AT et le 2-4 D.

IV. ACTION DE L'AT SUR LES ACTIVITÉS DES ORGANITES CELLULAIRES ISOLÉS

Dans le but de préciser le mécanisme d'action de l'AT, les recherches suivantes ont été entreprises sur des chloroplastes isolés d'*Oryza sativa* L. traité ou non par l'AT. Divers auteurs ayant montré que l'ion NH_4^+ exerce une action dépressive

sur la phosphorylation photosynthétique et une action stimulante sur la réaction de HILL (KROGMANN, JAGENDORF et AVRON, 1959 ; GOOD, 1960), il a paru intéressant de chercher à savoir, si l'AT, par sa fonction amine, ne serait pas aussi un découpleur de la photophosphorylation. Par ailleurs, comme les résultats exposés dans les paragraphes précédents (voir I A₁ et II A) indiquent que l'AT provoque une inhibition de la croissance et une exaltation de l'intensité respiratoire, on est tenté de penser à la possibilité d'une analogie d'action avec le 2-4 dinitrophénol (DNP), découpleur classique des phosphorylations oxydatives ; l'étude de l'action éventuelle de l'AT sur l'activité phosphorylante des mitochondries isolées s'impose ainsi. Malheureusement, les feuilles et les racines de Riz ont donné des préparations mitochondriales peu actives. Ce sont donc les mitochondries isolées d'hypocotyles étiolés de Concombre qui ont été testées. Le fait que même les suspensions mitochondriales obtenues à partir des racines de Riz ne sont pas actives est peut-être dû à la pauvreté de ces organes en mitochondries et serait en relation avec leur mode de vie en anaérobiose.

A. Activité des chloroplastes isolés

1) Réaction de Hill des chloroplastes de feuilles non traitées

Pour l'étude de l'action *in vitro* de l'AT sur la réaction de HILL, les chloroplastes sont isolés en milieu aqueux à partir des feuilles n^{os} 6 et 7 d'*Oryza sativa* L. âgé de 2 mois, non traitées. L'AT est ajouté au milieu réactionnel en concentrations croissantes. Les réactifs de HILL employés sont, soit le ferricyanure de potassium, soit le dichlorophénolindophénol (DPIP). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Activité Hill des chloroplastes isolés d'Oryza sativa L. en présence de concentrations croissantes d'AT

L'activité est exprimée en microlitres d'O₂ dégagés par mg de chlorophylle et par heure.

Eclairement : 85 000 lux quand le réactif de Hill est le K₃Fe(CN)₆.

43 000 lux quand le réactif de Hill est le DPIP.

Température : 15 °C.

Composition du milieu réactionnel : voir texte (Méthodes et techniques, paragraphe F₃).

Système phosphorylant	Réactifs de Hill	Témoins	Concentrations d'AT (M)		
			5.10 ⁻³	5.10 ⁻²	5.10 ⁻¹
ADP+P+Mg ⁺⁺ (¹)	K ₃ Fe(CN) ₆	366	363	371	122
	DPIP	440	500	438	146
	K ₃ Fe(CN) ₆	592	576	607	
	K ₃ Fe(CN) ₆	462	468	483	

(¹) Le système phosphorylant (ADP+P+Mg⁺⁺) est constitué par : ADP : 10 µM - tampon phosphate pH 7 : 10 µM - MgCl₂ : 10 µM.

L'activité HILL, exprimée par unité de chlorophylle et par heure, n'est pas affectée par l'AT à $5 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-2}$ M ; on ne constate ni dépression, ni stimulation. S'inspirant d'un des critères définis par KROGMANN *et al.* (1959), des réactions de HILL ont été réalisées d'une part en présence d'un système de phosphorylation (ADP + phosphate + Mg^{++}), et d'autre part, en présence d'AT à $5 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-2}$ M. Les résultats montrent que le dégagement d' O_2 est stimulé par la phosphorylation concomitante, mais qu'il n'est pas du tout exalté par l'AT : manifestement, l'AT, à $5 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-2}$ M, ne répond pas aux critères de découpleur décrits par KROGMANN *et al.*

Si l'AT est ajouté au milieu réactionnel à la concentration massive de $5 \cdot 10^{-1}$ M, l'activité HILL se trouve alors inhibée de 70 à 80 % environ par rapport à celle des chloroplastes témoins.

Aux concentrations qui inhibent le verdissement des feuilles et jusqu'à $5 \cdot 10^{-2}$ M, l'AT n'a aucune action sur la réaction de HILL en présence de $K_3Fe(CN)_6$ ou de DPIP. Seule, la concentration la plus élevée ($5 \cdot 10^{-1}$ M) est inhibitrice.

2) Photophosphorylations des chloroplastes de feuilles non traitées

Pour cette étude, les chloroplastes isolés de *Spinacia oleracea* L. et de *Bryophyllum daigremontianum* Berger ont été testés, en plus de ceux isolés d'*Oryza sativa* L. (PHUNG-NHU-HUNG, 1964).

Le tableau IX résume les principaux résultats obtenus pour la *photophosphorylation cyclique* avec différents cofacteurs, et en présence de concentrations croissantes d'AT.

TABLEAU IX

Action in vitro de l'AT en concentrations croissantes sur la photophosphorylation cyclique réalisée par des chloroplastes isolés

L'activité phosphorylante est exprimée en micromoles d'ATP formées par mg de chlorophylle et par heure.

Eclairement : 85 000 lux. Température 15 °C.

Composition du milieu réactionnel : voir texte (Méthodes et techniques, paragraphe F 4a).

Source de chloroplastes	Cofacteurs	Témoins	Concentrations d'AT (M)					
			10^{-3}	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$5 \cdot 10^{-2}$	10^{-1}	$5 \cdot 10^{-1}$
Riz	FMN	35	37	33	33	27	27	1
	Vit. K_3	33	34	33	30	30	28	6
Epinard	FMN	124	137	122	133	102	95	5
	Vit. K_3	148	150	150	150	113	113	—
Riz	PMS	82	99	147	156	139	109	5
<i>Bryophyllum</i> ..	PMS	125	—	—	—	195	—	—

Avec le flavine mononucléotide (FMN) ou la vitamine K_3 comme cofacteurs, l'AT n'exerce aucune action sur la phosphorylation photosynthétique des chloroplastes de Riz et d'Epinard, aux concentrations inférieures à $5 \cdot 10^{-2}$ M. Mais à $5 \cdot 10^{-2}$ M, le taux de phosphorylation des chloroplastes traités montre une légère

diminution (20 %). Cette inhibition augmente avec la concentration d'AT ; à $5 \cdot 10^{-1} \text{ M}$, elle est de 100 %. (Il a été soigneusement vérifié que le pH du milieu réactionnel n'est absolument pas modifié par l'addition d'AT à dose massive).

Quand le cofacteur est du phénazine méthosulfate (PMS), l'AT de 10^{-3} M à 10^{-1} M présente la particularité de stimuler la photophosphorylation (Riz et *Bryophyllum*) ; l'augmentation du taux d'ATP formé peut atteindre 90 %. L'effet inhibiteur de l'AT ne se manifeste qu'aux très fortes concentrations, supérieures à 10^{-1} M , de façon brutale et totale (90 % d'inhibition à $5 \cdot 10^{-1} \text{ M}$).

Les résultats de la *photophosphorylation non cyclique* et du dégagement simultané d' O_2 sont exposés dans le tableau X.

TABLEAU X

Action in vitro de l'AT en concentrations croissantes sur la photophosphorylation non cyclique réalisée par des chloroplastes isolés

L'activité phosphorylante (P) est exprimée en micromoles d'ATP formées par mg de chlorophylle et par heure.

L'activité Hill (O) est exprimée en microlitres d' O_2 dégagés par mg de chlorophylle et par heure. Conditions de l'expérience et composition du milieu réactionnel : voir tableau VIII.

		Concentrations d'AT (M)							
Source de chloroplastes	Cofacteurs	Témoins		$5 \cdot 10^{-3}$		$5 \cdot 10^{-2}$		$5 \cdot 10^{-1}$	
		P	O	P	O	P	O	P	O
Epinaud	NADP ⁽¹⁾	42	358	40	320	32	270	0	0
Epinaud	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	79	792	81	804	77	800	4	147
<i>Bryophyllum</i>	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	34	277	33	271	33	299	3	103

⁽¹⁾ Les chloroplastes ont été brisés en les mettant en suspension dans un milieu hypotonique (NaCl 0,035 M). Le milieu réactionnel contient en plus de l'extrait de chloroplastes (surnageant obtenu par centrifugation à 0 °C pendant 30 mn à 20 000 g de la suspension de chloroplastes brisés).

Avec le NADP, le taux de phosphorylation et le dégagement d' O_2 sont diminués de la même manière (20 %) par l'AT à $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$. Les chloroplastes sont entièrement inhibés à $5 \cdot 10^{-1} \text{ M}$ (Epinaud).

La photophosphorylation liée à la réduction du ferricyanure semble un peu moins sensible à l'action inhibitrice de l'AT. A $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, aucune diminution de l'ATP formé et du dégagement d' O_2 n'est encore constatée, et à $5 \cdot 10^{-1} \text{ M}$, tandis que la photophosphorylation est presque complètement inhibée, le volume d' O_2 dégagé reste égal au 1/3 ou au 1/5 de celui des témoins (Epinaud et *Bryophyllum*).

Ces résultats montrent que l'AT, aux concentrations inférieures à $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, non seulement n'exerce aucune inhibition sur la photophosphorylation cyclique, mais peut même avoir une action stimulante sur la photophosphorylation catalysée par le PMS. Ce n'est qu'aux très fortes doses ($5 \cdot 10^{-1} \text{ M}$) que l'AT inhibe presque complètement la photophosphorylation cyclique, quel que soit le cofacteur. Pour la photophosphorylation non cyclique et l'émission d' O_2 qui l'accompagne, en présence de NADP, l'inhibition est de l'ordre de 20 % pour la concentration en AT de $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ (et elle est

totale à $5 \cdot 10^{-1}$ M). En présence de $K_3Fe(CN)_6$, elle ne se manifeste pas à $5 \cdot 10^{-2}$ M ($A \cdot 5 \cdot 10^{-1}$ M par contre, elle est nette et plus marquée pour la photophosphorylation que pour la réaction de Hill).

3) Photophosphorylation cyclique et réaction de Hill des chloroplastes de feuilles blanchies

Les chloroplastes sont isolés des 8^e feuilles de Riz blanchies par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M. Seule, l'étude de la réaction de Hill liée à la réduction du ferricyanure et de la photophosphorylation cyclique, avec le PMS comme cofacteur, a été faite (tableau XI).

Les suspensions de chloroplastes isolés à partir des feuilles de Riz blanchies par l'AT sont caractérisées par un rapport chlorophylle/N protéique nettement inférieur à celui des chloroplastes isolés de feuilles vertes (0,07 contre 1,2), ce qui indique une diminution de la quantité de chlorophylles relativement plus importante que celle de la quantité de protéines.

TABLEAU XI

Activité Hill et photophosphorylation des chloroplastes isolés des 8^e feuilles d'*Oryza sativa* L., blanchies par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, (Tm : témoins)

L'activité Hill est exprimée en microlitres d'O₂ dégagés par heure, soit par mg de chlorophylle (O_{chl}), soit par mg d'N protéique (O_{Np}).

L'activité photophosphorylante est exprimée en micromoles d'ATP formées par heure, soit par mg de chlorophylle (P_{chl}), soit par mg d'N protéique (P_{Np}).

Réactif de Hill : $K_3Fe(CN)_6$. Cofacteur de photophosphorylation : PMS.

Conditions de l'expérience et composition du milieu réactionnel : voir Tableaux VIII et IX.

Chloroplastes des 8 ^e feuilles	Cofacteur et réactif de Hill	Activité Hill		Activité photophos- phorylante		Chlorophylle
		O _{chl}	O _{Np}	P _{chl}	P _{Np}	N protéique (en masse)
Tm	$K_3Fe(CN)_6$	370	443			1,2
AT		83	6			0,07
Tm	PMS			113	136	1,2
AT				14	1	0,07

L'activité photophosphorylante et l'activité HILL de ces chloroplastes, exprimées par mg de chlorophylle, ne représentent que 12 à 20 % de celles des chloroplastes de feuilles vertes témoins. Si l'ATP formé et l'O₂ dégagé sont calculés sur la base de l'N protéique des suspensions de chloroplastes, le rapport est bien plus faible encore et atteint seulement 0,7 à 1 %.

Les complexes pigmentaires des chloroplastes appauvris en chlorophylles et en protéines par l'action antérieure de l'AT ont donc perdu beaucoup de leur efficacité vis-à-vis de la réaction de Hill comme de la photophosphorylation.

4) Discussion et conclusions

Aux concentrations inférieures à $5 \cdot 10^{-2}$ M, l'AT n'exerce aucune action directe sur la réaction de HILL des chloroplastes isolés : on n'observe ni inhibition, ni stimulation. L'absence d'activation de la réaction de HILL par l'AT est en accord avec les

conclusions de GOOD (1960); selon cet auteur, alors que toutes les amines « mono-fonctionnelles », comme l'ammoniaque, la méthylamine, l'éthylamine, la n-hexylamine, la cyclohexylamine, la diéthylamine et la triéthylamine, activent la réaction de HILL, les amines « polyfonctionnelles », telles que le 1,2-diaminoéthane, le 1,5-diaminopentane, le 2-aminoéthanol, la lysine, l'arginine, l'hydroxylamine, le 2-amino-1,2,4-triazol, sont inactives.

L'AT n'exerce non plus aucune inhibition sur la photophosphorylation, que celle-ci soit stimulée par le FMN, la vit. K₃, le PMS, le K₃Fe(CN)₆ ou le NADP.

Le mode d'action de cet herbicide en faibles concentrations n'est donc pas dans l'inhibition de la photosynthèse. De ce fait, l'AT n'a aucune parenté d'action avec le groupe des amino-triazines, en particulier la 2-chloro-4,6 bis (éthylamine) sym-triazine, ou simazine, laquelle, dès les concentrations de $1,5 \cdot 10^{-7}$ M et $4,6 \cdot 10^{-6}$ M, inhibe déjà de 50 % la réaction de HILL des chloroplastes d'Orge (MORELAND, GENTNER, HILTON et HILL, 1959) et la photophosphorylation, catalysée par le FMN, des chloroplastes de Pois (BISHOP, 1962).

L'inhibition de la photophosphorylation et de la réaction de HILL, observée aux très fortes doses d'AT dans le milieu réactionnel ($5 \cdot 10^{-1}$ M), peut être due à l'augmentation de la pression osmotique du milieu. En effet, la même inhibition a été obtenue en ajoutant au milieu réactionnel, à la place de l'AT, du saccharose ou du NaCl à $5 \cdot 10^{-1}$ M.

La perte de la capacité de réduction et de photophosphorylation des chloroplastes isolés de feuilles de Riz blanchies par l'AT peut être attribuée en valeur absolue à l'appauvrissement de ces chloroplastes en chlorophylles. Mais cette perte est due aussi à l'appauvrissement en cofacteurs spécifiques. Puisqu'elle se manifeste lorsque les résultats sont exprimés par unité de chlorophylle, on ne peut l'attribuer à la simple perte de pigments. On peut penser aussi à une inhibition du type topographique, car BARTELS (1965) et GUILLOT-SALOMON (1966) ont pu observer, en microscopie électronique, une complète désorganisation du système lamellaire, dans les chloroplastes de tissus de Blé et de Maïs, dépigmentés par l'AT ; on comprend qu'une telle altération dans la structure des appareils fonctionnels peut ne pas favoriser les échanges, qui doivent être rapides, de transporteurs d'énergie et de substrats. En somme, la forte diminution des activités photochimiques et enzymatiques, liées à la photosynthèse, des feuilles dépigmentées par l'AT, n'est qu'un effet indirect du toxique.

B. Activité des mitochondries isolées

1) Action directe *in vitro* de l'AT sur la phosphorylation oxydative

Pour cette étude, les mitochondries testées ont été isolées des hypocotyles de germinations étiolées, et âgées de 7 jours, de *Cucumis sativus* L. Le Concombre a été choisi pour ses germinations parfaitement homogènes et exemptes de moisissures. Seule, la phosphorylation liée à l'oxydation du succinate a été étudiée. L'AT est ajouté au milieu réactionnel en concentrations croissantes (PHUNG-NHU-HUNG, 1966). Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau XII.

L'AT, ajouté au milieu réactionnel aux concentrations de $2 \cdot 10^{-3}$ M et $2 \cdot 10^{-2}$ M, n'exerce pas d'action significative, *in vitro*, sur l'absorption d'O₂ et la formation d'ATP des mitochondries de Concombres. Le rapport P/O reste identique à celui des témoins. Mais à $2 \cdot 10^{-1}$ M, sans aucune variation apparente du rapport P/O,

TABLEAU XII

Action in vitro de l'AT en concentrations croissantes et de quelques autres substances sur la phosphorylation oxydative de mitochondries isolées d'hypocotyles de Cucumis sativus L.

L'activité respiratoire (O) est exprimée en microatomes d'O₂ absorbés par mg d'azote protéique. L'activité phosphorylante (P) est exprimée en micromoles d'ATP formées par mg d'azote protéique.

Temps de réaction : 20 mn.

Conditions de l'expérience et composition du milieu réactionnel, voir texte (Méthodes et techniques, paragraphe F 4 b).

	Substances ajoutées au milieu réactionnel	Concentration des substances ajoutées (M)	O	P	P/O
Exp. I	Témoin	0	2,16	4,05	1,87
	AT	$2 \cdot 10^{-3}$	2,46	4,64	1,88
		$2 \cdot 10^{-2}$	2,48	4,42	1,77
		$2 \cdot 10^{-1}$	0,98	1,71	1,75
Exp. II	Témoin	0	2,21	4,36	1,98
	Saccharose	$3 \cdot 10^{-1}$	1,16	2,31	1,98
	NaCl	$2 \cdot 10^{-1}$	0,51	1,03	2,02
Exp. III.....	Témoin	0	2,49	4,51	1,81
	DNP	10^{-5}	2,41	2,76	1,14
		10^{-4}	2,76	0,33	0,12

la respiration et la phosphorylation oxydative sont toutes deux diminuées de 50 à 60 % environ par rapport au témoin. L'action inhibitrice de l'AT est très vraisemblablement due à l'augmentation de la pression osmotique du milieu réactionnel, comme le montre l'expérience II réalisée avec des concentrations élevées de saccharose ou de NaCl.

In vitro, l'AT n'agit donc pas comme le dinitrophénol (DNP) (exp. III, tableau XII). Celui-ci, dès la concentration de 10^{-5} M, inhibe déjà la formation d'ATP d'environ 40 %. A 10^{-4} M, l'inhibition est presque totale (90 %) alors qu'à la concentration de 10^{-2} M, l'AT est à peu près sans action. Dans les deux cas, la respiration reste égale à celle des témoins ou est légèrement exaltée.

2) Phosphorylation oxydative des mitochondries de plantules étiolées de Concombre prétraitées par l'AT

Dans ces expériences, après 36 à 96 h de germination, les plantules de Concombre sont arrosées et laissées en contact avec de l'AT, à différentes concentrations (de $2 \cdot 10^{-5}$ M à $2 \cdot 10^{-2}$ M), pendant 4 jours (PHUNG-NHU-HUNG, 1966). Le tableau XIII résume les effets de l'AT aux concentrations efficaces sur la croissance de ces plantules. Les résultats de la phosphorylation oxydative des mitochondries isolées des germinations ainsi prétraitées par l'AT sont réunis dans le tableau XIV.

La croissance des plantules de Concombre, même très jeunes (36 h), arrosées de solution d'AT $2 \cdot 10^{-5}$ M et $2 \cdot 10^{-4}$ M, ne montre aucune différence avec celle des témoins, après 4 jours de traitement. De même, la respiration et la phosphorylation des mitochondries isolées sont égales pour les témoins et les sujets traités (Tableau XIV).

TABLEAU XIII

Variations en longueur et en masses de substance fraîche et de substance sèche des hypocotyles de plantules étiolées de Cucumis sativus L. traitées par l'AT.

Hypocotyles et leur âge	Longueur cm/organe	Masse de substance fraîche g/10 plantes	Masse de substance sèche g/10 plantes
Initiaux (36 h).....	1,5	1,09	0,26
Témoins (132 h)	14	10,42	2,97
Traitées 4 j par l'AT à $2 \cdot 10^{-3}$ M (132 h)	11,2	8,20	2,35
Traitées 4 j par l'AT à $2 \cdot 10^{-2}$ M (132 h)	2,2	1,56	0,44
Initiaux (96 h).....	6,2	4,50	1,28
Témoins (192 h)	16	11,60	3,32
Traitées 4 j par l'AT à $2 \cdot 10^{-2}$ M (192 h)	7,8	5,82	1,65

TABLEAU XIV

Phosphorylation oxydative des mitochondries isolées d'hypocotyles de Cucumis sativus L. prétraités par l'AT et par quelques autres substances

L'activité respiratoire (O) est exprimée en microatomes d'O₂ absorbés par mg d'azote protéique. L'activité phosphorylante (P) est exprimée en micromoles d'ATP formées par mg d'azote protéique. Durée du prétraitement : 4 jours. Temps de réaction : 20 mn.

Conditions de l'expérience et composition du milieu réactionnel : voir texte (Méthodes et techniques, paragraphe F 4 b).

	Age des plantules au moment du traitement	Substances et concentrations (M) utilisées pour les traitements	Croissance (masse de substance sèche par rapport au témoin pris égal à 100)	O	P	P/O
Exp. I	36 h	0	100	2,14	4,12	1,92
		AT $2 \cdot 10^{-5}$	100	2,38	4,34	1,81
		AT $2 \cdot 10^{-4}$	100	2,22	4,36	1,96
Exp. II	36 h	0	100	2,14	4,46	2,08
		AT $2 \cdot 10^{-3}$	80	2,64	1,94	0,72
		DNP $3 \cdot 10^{-4}$	85	3,02	0,86	0,28
		NaCl $2 \cdot 10^{-2}$	100	2,61	5,41	2,07
Exp. III	2 jours	0	100	2,04	3,58	1,75
		AT $2 \cdot 10^{-3}$	100	2,24	3,50	1,56
		AT $2 \cdot 10^{-2}$	15	—	—	—
Exp. IV	4 jours	0	100	1,78	3,82	2,14
		AT $2 \cdot 10^{-2}$	50	2,26	0,38	0,17

A $2 \cdot 10^{-3}$ M, l'AT provoque, après 4 jours, et seulement chez les jeunes plantes âgées de 36 h au moment du traitement, un ralentissement de la croissance des hypocotyles de 20 %, aussi bien en longueur qu'en masse de substance sèche. Alors que

l'absorption d' O_2 des mitochondries isolées a légèrement augmenté (20 %), l'activité phosphorylante, au contraire, a diminué de 60 %, entraînant ainsi une chute de 65 % du rapport P/O. Ce découplage disparaît quand les plantes sont âgées de 2 jours au moment du traitement ; il semble que la concentration d'AT de $2 \cdot 10^{-3}$ M appliquée aux plantes soit devenue trop faible pour une masse de substance beaucoup plus élevée.

C'est ainsi qu'en arrosant les jeunes plantes de Concombre, âgées de 2 jours, avec une solution d'AT dont la concentration est augmentée à $2 \cdot 10^{-2}$ M, on arrive à bloquer presque complètement leur croissance, laquelle ne représente plus que 15 % environ de celle des témoins. Les différences morphologiques entre témoins et traités sont alors frappantes (fig. 6). Les axes hypocotylés des germinations traitées sont courts et trapus ; il en est de même de leurs racines principales lesquelles sont, en outre, absolument dépourvues de racines secondaires. Pour atténuer les effets

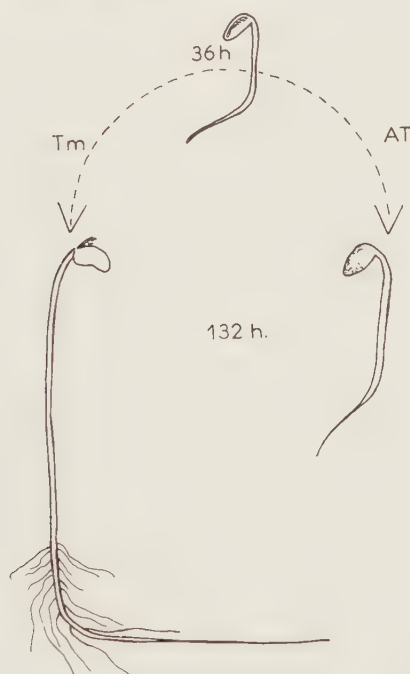


FIG. 6. — Schéma des différences morphologiques induites par l'AT à $2 \cdot 10^{-2}$ M sur des germinations de *Cucumis sativus* L.

Tm : témoin.

AT : traité par l'AT à $2 \cdot 10^{-2}$ M.

de l'AT à $2 \cdot 10^{-2}$ M, les plantules ne sont soumises au traitement à l'AT qu'après 4 jours de germination ; leur croissance subit alors, après 4 jours de contact, une diminution de 50 % seulement par rapport à celle des témoins. Les mitochondries extraites ont une absorption d' O_2 légèrement exaltée (30 %) ; par contre, leur phosphorylation présente 90 % d'inhibition (Tableau XIV).

Ce découplage *in vivo* des phosphorylations oxydatives n'est pas dû à l'effet de la pression osmotique. En effet, les jeunes plantes de Concombre, âgées de 36 h,

et arrosées avec une solution de NaCl $2 \cdot 10^{-2}$ M, ne présentent aucune différence de croissance avec les témoins ; la respiration et la phosphorylation oxydative des mitochondries isolées sont même légèrement exaltées (exp. II, tableau XIV). Ce découplage est bien caractéristique de l'AT comme du DNP. Avec le DNP, à la concentration de $3 \cdot 10^{-4}$ M, la formation d'ATP dans les mitochondries extraites de plantes prétraitées est inhibée de 80 %, alors que l'absorption d'O₂ a augmenté de 40 %.

L'action découplante de l'AT se manifeste donc lors du prétraitement, alors qu'elle est nulle par addition du toxique directement aux préparations in vitro.

3) Discussion et conclusions

L'ensemble de ces résultats montre que l'AT, aux concentrations inférieures à $2 \cdot 10^{-1}$ M, ne peut exercer *in vitro* aucun découplage direct sur la phosphorylation oxydative des mitochondries isolées de plantules étiolées de Concombre, à l'inverse du DNP et de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2-4 D) (WEDDING et BLACK, 1962). Si la concentration en AT dans le milieu réactionnel atteint $2 \cdot 10^{-1}$ M, l'absorption d'O₂ et la formation d'ATP des mitochondries de Concombre sont toutes deux inhibées de 50 à 60 %. Dans ce cas, l'inhibition n'est pas spécifique à l'AT, elle est due simplement à l'augmentation de la pression osmotique du milieu réactionnel.

Par contre, les phosphorylations oxydatives de mitochondries isolées de plantes prétraitées par l'AT à $2 \cdot 10^{-3}$ et $2 \cdot 10^{-2}$ M sont découplées.

L'absence d'action *in vitro* de l'AT suggère que le découplage, obtenu après prétraitement des germinations par l'AT, serait un effet indirect plutôt que direct de l'herbicide. Selon plusieurs auteurs (HANSON, 1959 ; KEY, HANSON et BILLS, 1960), l'activité phosphorylante des mitochondries est fonction de la quantité d'ARN qu'elles contiennent. Si on rapprochait ces observations de l'inhibition par l'AT de la synthèse d'ARN à la lumière dans les germinations de Pois (SCHWEIZER et ROGERS, 1964), de Blé (BARTELS et WOLF, 1965) ou dans les cultures de Chlorelles (GUÉRIN-DUMARTRAIT, 1966), la baisse de l'activité phosphorylante des mitochondries isolées des germinations prétraitées par l'AT pourrait être attribuée à une chute de leur teneur en ARN. Cependant, en tenant compte du fait que les plantes ont poussé à l'obscurité et que la synthèse d'ARN dans les tissus de plantes étiolées n'est nullement affectée par l'AT (BARTELS et WOLF, 1965), il apparaît que le découplage des phosphorylations oxydatives, après action de l'AT *in vivo*, devrait être lié à d'autres causes. Peut-être tout simplement les mitochondries isolées de plantes prétraitées sont-elles plus fragiles et par suite, plus facilement abîmées au cours de l'extraction ? Peut-être encore ces mitochondries ont-elles perdu leur activité phosphorylante à la suite d'altérations profondes de leur structure, car l'absorption d'O₂ est plutôt exaltée. Il n'y a donc pas altération apparente du mécanisme des oxydations terminales, mais seulement de la phosphorylation.

Il est à remarquer que la chute de la phosphorylation est observée seulement avec des mitochondries extraites de plantules dont la croissance est ralentie. Devant cette relation évidente entre le découplage et la diminution de croissance, il est permis de penser à deux possibilités : l'inhibition de la croissance des plantes serait due, en partie au moins, au manque de formation d'ATP, ou bien, la baisse dans la synthèse d'ATP, ne serait que la conséquence de l'inhibition de la croissance. La dernière supposition rejoint l'hypothèse d'une diminution d'activité liée aux modifications structurales dans l'agencement des intermédiaires du couplage des oxydations et de la phosphorylation.

Il faut encore observer qu'une inhibition analogue s'est manifestée avec les chloroplastes des feuilles blanchies à propos de la photophosphorylation cyclique obtenue en présence de PMS.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ces recherches ont abouti aux conclusions suivantes qui précisent le mode d'action de l'AT sur le métabolisme des feuilles d'*Oryza sativa* L.

La croissance terminale des plantes de Riz âgées de 2 mois est considérablement inhibée par l'AT, à partir de la concentration $6 \cdot 10^{-5}$ M. A $1,2 \cdot 10^{-5}$ M, seuil des concentrations efficaces, l'AT permet encore une formation des feuilles au même rythme que celui des plantes non traitées.

Les feuilles de Riz qui ont pu se développer en présence de l'inhibiteur sont cependant légèrement plus courtes que les témoins du même âge. L'examen au microscope des cellules épidermiques de ces feuilles a donné des résultats qui s'accordent avec les observations de nombreux auteurs sur l'inhibition des divisions cellulaires par l'AT. Comparées aux feuilles normales, les feuilles traitées sont caractérisées par une teneur en eau légèrement supérieure et une teneur en glucides réducteurs et en saccharose qui est réduite de moitié. Leur durée de vie est assez limitée et ne dépasse pas 3 semaines.

Les feuilles de Riz formées en présence d'AT présentent, en outre, une diminution dans la production de matériel végétal qui se traduit par une baisse de 30 % de leur masse de substance sèche. Cette diminution peut être attribuée principalement à une réduction de la synthèse apparente des protéines d'environ 60 % par rapport aux témoins.

L'inhibition de la protéogenèse est cependant moins sévère que celle de la synthèse des pigments chloroplastiques. Les feuilles traitées sont pratiquement dépigmentées ; leur teneur en chlorophylles et en caroténoïdes ne représente plus que 6 % et 15 % respectivement de celle des témoins. Il semble néanmoins que les mécanismes de synthèse des chlorophylles et des caroténoïdes sont différemment sensibles à l'action de l'AT. Alors qu'en présence de l'inhibiteur, la synthèse des chlorophylles est bloquée rapidement, de même que celle du β -carotène, la lutéine, par contre, se forme en quantité relativement appréciable à côté d'un pigment nouveau du groupe du lycopène.

Les altérations pigmentaires provoquées par l'AT sont irréversibles, mais n'atteignent que les régions en cours de différenciation au moment de l'action du toxique. L'inhibition de la pigmentogenèse cesse avec l'interruption de l'apport de l'inhibiteur.

Si on rapproche tous ces faits de la nette diminution de la synthèse des acides nucléiques, du déficit de protéogenèse, de la disparition presque totale du phosphatidylglycérol, des galactolipides et du sulfolipide et enfin de la complète désorganisation du système lamellaire plastidial, révélés par divers auteurs dans de nombreux tissus foliaires blanchis par l'AT, il apparaît qu'ils sont, dans l'ensemble, compatibles avec l'hypothèse d'un arrêt du développement normal des chloroplastes, sous l'action de l'AT.

Dans des conditions de lumière non saturante (2 000 lux), l'émission photosynthétique d'O₂ des feuilles de Riz blanchies par l'AT, exprimée par unité de substance sèche ou de protéines, ne représente que 20 à 30 % environ de celle des feuilles

vertes. Mais si elle est exprimée par unité de chlorophylle, elle est triple de celle des témoins, ce qui montre que le déficit de la pigmentation des feuilles est le facteur limitant essentiel de la photosynthèse. Lorsque la lumière est saturante (85 000 lux), l'activité photophosphorylante et l'activité HILL des chloroplastes isolés de ces feuilles dépigmentées, exprimées par unité de chlorophylle, représentent 12 à 20 % seulement de celles des chloroplastes de feuilles vertes témoins. Il semble que l'inhibition de la réaction de HILL et de la photophosphorylation est due non seulement à l'appauvrissement des chloroplastes en pigments mais aussi à un manque particulier de cofacteurs spécifiques, sous l'effet de l'AT.

En outre, dans les feuilles traitées, la photosynthèse paraît être limitée par la réaction enzymatique de formation du PGA à partir du RuDP et de CO_2 . En effet, l'activité RuDP-carboxylase de ces feuilles se trouve être environ 2,5 fois plus faible que celle des feuilles témoins.

Par contre, lorsque l'AT est ajouté directement, et en faibles concentrations, aux préparations *in vitro*, on ne constate aucune action du toxique, tant sur les réactions photochimiques que sur la carboxylation enzymatique du RuDP. L'inhibition de la réaction de HILL et de la photophosphorylation, obtenue aux très fortes doses d'AT ($2 \text{ à } 5 \cdot 10^{-1} \text{ M}$), est due simplement à l'augmentation de la pression osmotique du milieu réactionnel.

De tous ces faits, il ressort que la faible activité photosynthétique des feuilles de Riz, sous l'action de l'AT, n'est pas due à une action directe de l'inhibiteur sur les réactions photochimiques et enzymatiques liées à la photosynthèse, mais qu'elle est plutôt la conséquence de l'inhibition par l'AT de la synthèse des pigments, des cofacteurs spécifiques des photophosphorylations et de l'enzyme RuDP-carboxylase.

En opposition avec la réduction de l'intensité photosynthétique, l'absorption respiratoire d' O_2 des feuilles de Riz traitées par l'AT à $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ est nettement exaltée ; exprimée par unité de substance sèche ou de protéines, elle est le double environ de celle des témoins. Il semble que, dans ces conditions, les feuilles doivent s'épuiser, ce qui expliquerait au moins en partie la diminution de leur teneur en glucides réducteurs et en saccharose.

Il est probable que l'intensité respiratoire élevée des organes traités est plus ou moins en relation avec l'exaltation des activités de deux enzymes, la glucose-6-P déshydrogénase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase ; exprimées en μM de NADP réduit par mg d'N protéique du broyat foliaire, les activités G-6-P déshydrogénase et 6-PG déshydrogénase sont 2 à 3 fois plus élevées que celles des feuilles vertes. Ces résultats joints au fait que l'incorporation du ^{32}P , à l'obscurité, est faible dans le PGA et intense dans les hexoses-phosphates et les oses-diphosphates, suggèrent, dans les feuilles blanchies, une augmentation possible de l'activité de la voie d'oxydation directe du glucose et une inhibition parallèle au niveau de l'aldolase, en accord avec les observations de McWHORTER et PORTER (1960).

Si on rapproche l'exaltation des activités G-6-P déshydrogénase et 6-PG déshydrogénase de l'inhibition par l'AT de la synthèse des cofacteurs spécifiques de la photophosphorylation et de l'enzyme RuDP-carboxylase, l'action générale de l'AT sur la genèse des protéines-enzymes apparaît différentielle, très complexe et ne peut être réduite en une seule modalité.

L'étude de l'action directe *in vitro* de l'AT sur la phosphorylation oxydative des mitochondries isolées des hypocotyles étiolés de Concombre montre que l'herbicide n'agit pas comme le 2-4 dinitrophénol. Alors que celui-ci découple les oxydations

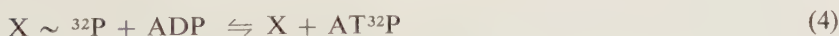
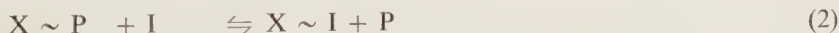
et la synthèse d'ATP dès la concentration de 10^{-5} M, l'AT est à peu près sans action à la concentration de 10^{-2} M. Aux très fortes doses ($2 \cdot 10^{-1}$ M), l'AT inhibe à la fois les oxydations et la phosphorylation, vraisemblablement par augmentation de la pression osmotique du milieu réactionnel.

L'action découplante de l'AT se manifeste cependant lors du prétraitement des jeunes plantes de Concombre. Les mitochondries isolées de ces plantes semblent avoir perdu seulement leur activité phosphorylante, alors que le mécanisme des oxydations terminales n'est pas altéré apparemment, puisque l'absorption d' O_2 est exaltée. Ici encore, se retrouve une action spécifique de l'AT. Il semble que seule, la synthèse des intermédiaires du couplage des oxydations et de la phosphorylation a été inhibée par l'AT, celle des transporteurs d'électrons n'ayant subi aucune diminution.

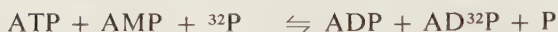
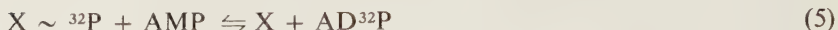
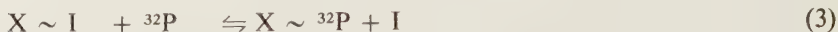
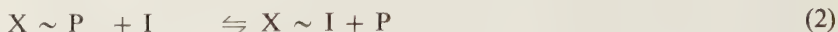
En résumé, ce travail a permis de constater que l'AT n'a aucune analogie d'action avec le 2-4 dinitrophénol, bien que tous deux provoquent les mêmes effets, à savoir l'inhibition de la croissance et l'exaltation de l'intensité respiratoire. En outre, cette étude a réussi à montrer que les effets nombreux et divers de l'AT sur le métabolisme cellulaire dérivent souvent d'une perturbation dans la synthèse des protéines. Cependant, cette action générale de l'AT sur la synthèse des protéines est loin d'être simple et d'une seule modalité. L'inhibition de la genèse des protéines-enzymes, sous l'action de l'AT, ne semble pas être générale et systématique. C'est ainsi que, dans les plantes traitées, la synthèse de la RuDP-carboxylase et des facteurs de couplage dans les phosphorylations est inhibée par le toxique, alors que ne l'est pas celle de la G-6-P déshydrogénase, de la 6-PG déshydrogénase et des transporteurs d'électrons des oxydations terminales. Donc, l'action générale de l'AT sur la protéogenèse se traduit plus précisément par des actions différentielles sur la genèse d'enzymes.

Le fait que l'incorporation du ^{32}P dans les adénosine-phosphates est au moins aussi active, sinon plus, dans les feuilles de Riz blanchies que dans les feuilles vertes témoins, contraste avec la perte des activités phosphorylantes observées dans les plantes traitées par l'AT. Les réactions d'échange des radicaux phosphates avec conservation des liaisons à potentiel énergétique élevé paraissent accélérées alors que les réactions de synthèse de ces liaisons sont inhibées. On peut évidemment imaginer une série de réactions rendant compte de ce phénomène, en faisant intervenir des intermédiaires hypothétiques tels que ceux imaginés par CHANCE et WILLIAMS (1956) pour les phosphorylations oxydatives ou par BALTSCHIEFFSKY et Von STEDINGK (1966) pour les photophosphorylations.

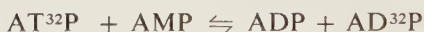
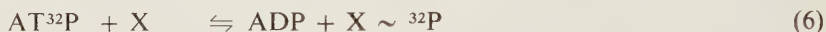
Si l'on appelle I et X ces intermédiaires, la série de réactions suivantes rendrait compte de la mobilité du phosphate terminal de l'ATP.



De même, la mobilité du « 2^e groupe phosphate » de l'ADP impliquerait des réactions du type :



Une autre variante du mécanisme de formation d'AD³²P serait possible également, à partir de AT³²P :



De tels mécanismes supposent évidemment la conservation du stock de liaisons à potentiel énergétique élevé, puisque leur synthèse paraît fortement diminuée. Il est vrai que, comparées aux feuilles normales, les feuilles de Riz non pigmentées sous l'action de l'AT ont des activités réduites (déficit de protéogénèse, absence de réduction photosynthétique du CO₂...). Cependant, le manque d'utilisation de l'ATP qui en résulte semble insuffisant pour expliquer, à lui seul, la conservation du stock de liaisons à haut potentiel énergétique. Aussi, cette contradiction entre la mobilité du ³²P dans les adénosines-phosphates et l'inhibition des activités phosphorylantes pose un problème intéressant, mais non encore résolu.

REMERCIEMENTS

J'exprime ma respectueuse gratitude à M. le Professeur L. PLANTEFOL, Membre de l'Institut, qui s'est toujours intéressé à mon travail.

J'exprime ma reconnaissance à M. le Professeur A. MOYSE qui m'a initiée à la recherche et m'a guidée dans ce travail.

Je suis aussi très reconnaissante à MM. les Professeurs H. CLAUSER et C. LIORET qui m'ont fait bénéficier de leurs précieux conseils.

Je remercie vivement Mme C. HUGUET, Maître de Recherche à l'I.N.R.A., qui m'a fourni gracieusement les semences de Riz et j'exprime ma cordiale gratitude à tous mes collègues dont j'ai beaucoup apprécié l'aide et la sympathie.

BIBLIOGRAPHIE

- AARONSON S., 1960. Mode of action of 3-amino-1,2,4-triazole on photosynthetic microorganisms. *J. Protozool.*, **7**, 289-294.
- AARONSON S. et SCHER S., 1960. - Effect of aminotriazole and streptomycin on multiplication and pigment production of photosynthetic microorganisms. *J. Protozool.*, **7**, 156-158.
- ALBAUM H.G., 1952. - The metabolism of phosphorylated compounds in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **3**, 35-58.

- AOKI S. et HASE, 1964. – De-and-regeneration of chloroplasts in the cells of *Chlorella protothecoides*. I. Syntheses of nucleic acids and protein in relation to the process of regeneration of chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **5**, 473-484.
- ARNON D.I., 1938. – Micro-elements in culture solution experiments with higher plants. *Amer. J. Bot.*, **25**, 322-325.
- ARNON D.I., 1949. – Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15.
- ARNON D.I., 1958. – Chloroplasts and photosynthesis. *Brookhaven Symp. Biol.*, **11**, 181-235.
- AUERBACH V.H., PIERINGER R.A. et WAISMAN H.A., 1959. – The effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the synthesis of tryptophane peroxidase-oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 370-379.
- AXELROD B., BANDURSKI R.S., GREINER C.M. et JANG R., 1953. – The metabolism of hexose and pentose phosphates in higher plants. *J. Biol. Chem.*, **202**, 619-634.
- AVRON M., 1960. – Photophosphorylation by Swiss-chard chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, **40**, 252-272.
- BALTSCHIEFSKY H. et VON STEDINGK L.V., 1966. – Energy transfer from two coupling sites in bacterial photophosphorylation. In *Currents in photosynthesis*, J.B. THOMAS et J.C. GOEDHEER éd. Ad. Donker, Publisher, Rotterdam, The Netherlands, 253-261.
- BANDURSKI R.S. et AXELROD B., 1951. – The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. *J. biol. Chem.*, **193**, 405-410.
- BARTELS P.G., 1965. – Effect of amitrole on ultrastructure of plastids in seedlings. *Plant Cell Physiol.*, **6**, 361-364.
- BARTELS P.G. et WOLF F.T., 1965. – The effect of amitrole upon nucleic acid and protein metabolism of wheat seedlings. *Physiol. Plant.*, **18**, 805-812.
- BASSHAM J.A. et CALVIN M., 1959. – Le cycle du carbone dans la photosynthèse. Dunod, éd., Paris.
- BENSON A.A., 1955. – Phosphorylated sugars. In *Modern methods of plant analysis*, Vol. II, K. PAECH et M.V. TRACEY éd., Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 113-144.
- BENSON A.A., BASSHAM J.A., CALVIN M., GOODALE T.C., HAAS V.A. et STEPKA W., 1950. – The path of carbon in photosynthesis. V. Paper chromatography and radioautography of the products. *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 1710-1718.
- BISHOP N.I., 1962. – Inhibition of the oxygen-evolving system of photosynthesis by amino-triazines. *Biochim. Biophys. Acta*, **57**, 186-189.
- BLACK C.C. et HUMPHREYS T.E., 1962. – Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on enzymes of glycolysis and pentose phosphate cycle. *Plant Physiol.*, **37**, 66-74.
- BOND T.J. et AKERS J., 1961. – Mechanism of growth inhibition of *Escherichia coli* by 3-amino-1,2,4-triazole. *J. Bacteriol.*, **81**, 327-328.
- BRANDON P.C., 1963. – Enzymological studies on pathways of crassulacean acid metabolism. KKI. Nederl. AKAD. Van WETENSCH, Amsterdam, Proc. Serv. C., **66**, 406-417.
- CARTER M.C., 1965. – Studies on the metabolic activity of 3-amino-1,2,4-triazole. *Physiol. Plant.*, **18**, 1054-1058.
- CARTER M.C. et NAYLOR A.W., 1960. – Metabolism of 3-amino-1,2,4-triazole 5-¹⁴C in plants. *Botan. Gaz.*, **122**, 138-143.
- CARTER M.C. et NAYLOR A.W., 1961 a. – Studies on an unknown metabolic product of 3-amino-1,2,4-triazole. *Physiol. Plant.*, **14**, 20-27.
- CARTER M.C. et NAYLOR A.W., 1961 b. – The effect of 3-amino-1,2,4-triazole upon the metabolism of carbon labeled sodium bicarbonate, glucose, succinate, glycine and serine by bean plants. *Physiol. Plant.*, **14**, 62-71.
- CASSETON P.J., 1964. – Reversal by histidine of the inhibition of *Prototheca* growth due to 3-amino-1,2,4-triazole. *Nature*, **204**, 93-94.
- CASTELFRANCO P., 1960. – Inhibition of some metalloprotein enzymes by 3-amino-1,2,4-triazole. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 485-491.
- CASTELFRANCO P. et BISALPUTRA T., 1965. – Inhibitory effect of amitrole on *Scenedesmus quadricauda*. *Amer. J. Bot.*, **52**, 222-227.
- CHAMPIGNY M.L., 1960. – L'influence de la lumière sur la genèse des acides aminés dans les feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* Berger. *Rev. gén. Bot.*, **67**, 65-216.

- CHANCE B. et WILLIAMS G.R., 1956. – The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advan. Enzymol.*, **17**, 65-134.
- CLAES H., 1956. – Biosynthese von Carotenoiden bei *Chlorella*. II. Tetrahydrolycopin und Lycopin. *Z. Naturforsch.*, **11 B**, 260-266.
- DE KOUCHKOVSKY Y., 1961. – Dispositif de photocolorimétrie de réactions photochimiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **43**, 667-672.
- DUMAZERT C. et MARCELET Y., 1938. – Sur un nouveau catalyseur de minéralisation en vue du dosage de l'azote par la méthode de KJELDAHL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **20**, 201-212.
- EMERSON R. et ARNOLD W., 1932. – A separation of the reaction on photosynthesis by means of intermittent light. *J. gen. Physiol.*, **15**, 391-420.
- FEINSTEIN R.N., BERLINER S. et GREEN F.O., 1958. – Mechanism of inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. *Arch. Biochem. Biophys.*, **76**, 32-44.
- FREDRICK J.F. et GENTILE A.C., 1960 a. – The formation of the glucose derivative of 3-amino-1,2,4-triazole under physiological conditions. *Physiol. Plant.*, **13**, 761-765.
- FREDRICK J.F. et GENTILE A.C., 1960 b. – The effect of 3-amino-1,2,4-triazole on phosphorylase of *Oscillatoria princeps*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **86**, 30-33.
- FREDRICK J.F. et GENTILE A.C., 1961. – The structure of the d-glucose adduct of 3-amino-1,2,4-triazole : infrared absorption studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 356-359.
- FREDRICK J.F. et GENTILE A.C., 1962. – Studies of a phosphorylated derivative of 3-amino-1,2,4-triazole formed by the action of yeast hexokinase. *Physiol. Plant.*, **15**, 186-193.
- FULLER R.C. et GIBBS M., 1959. – Intracellular and phylogenetic distribution of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase and d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Plant Physiol.*, **34**, 324-329.
- GARNIER-DARDART J., 1965. – Activités enzymatiques des chloroplastes isolés de feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* Berger : oxydation des hexoses, formation et dégradation d'acide malique. *Physiol. Vég.*, **3**, 215-227.
- GASCHEN M., 1963. – Action du 3-amino-1,2,4-triazol (ATA) sur la croissance en longueur du *Lens culinaris* Medikus. *Bull. Soc. Bot. suisse*, **73**, 227-276.
- GENTILE A.C. et FREDRICK J.F., 1959. – Chemical activity of the glucose adduct of 3-amino-1,2,4-triazole. *Physiol. Plant.*, **15**, 186-193.
- GOOD N.E., 1960. – Activation of the Hill reaction by amines. *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 502-517.
- GUÉRIN-DUMARTRAIT E., 1966. – Quelques effets du 3-amino-1,2,4-triazol sur *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Recherches sur l'action de l'aminotriazol sur la synthèse des acides nucléiques chez des Chlorelles cultivées en cultures synchrones. *Physiol. Vég.*, **4**, 135-193.
- GUILLOT-SALOMON T., 1966. – Action du 3-amino-1,2,4-triazol sur l'ultrastructure des chloroplastes de Maïs. *C.R. Acad. Sci.*, **262**, 2510-2513.
- GUILLOT-SALOMON T., SIGNOL M. et DOUCE R., 1966. – Relation entre les modifications de l'ultrastructure plastidiale et la composition en lipides polaires de feuilles de Maïs traitées par l'aminotriazol. *C.R. Acad. Sci.*, **263**, 264-267.
- HALL W.C., JOHNSON S.P. et LEINWEBER C.L., 1954. – Aminotriazole—a new abscission chemical and growth inhibitor. *Texas Agr. Exp. Sta. Bull.* N° 789.
- HANES C.S. et ISHERWOOD F.A., 1949. – Separation of the phosphoric esters in the filter paper chromatogram. *Nature*, **164**, 1107-1112.
- HANSON J.B., 1959. – The effect of ribonuclease on oxidative phosphorylation by mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1303-1306.
- HEIM W.G., APPLEMAN D. et PYEROM H.T., 1956. – Effects of 3-amino-1,2,4-triazole (AT) on catalase and other compounds. *Amer. J. Physiol.*, **186**, 19-23.
- HERRETT R.A. et LINCK A.J., 1957. – The influence of 3-amino-1,2,4-triazole on the carbohydrate balance and respiration in Canada thistle (*Cirsium arvense*). *Plant Physiol.*, **32**, suppl. VI.
- HERRETT R.A. et LINCK A.J., 1961. – The metabolism of 3-amino-1,2,4-triazole by Canada thistle and field bindweed and the possible relation to its herbicidal action. *Physiol. Plant.*, **14**, 767-776.
- HILTON J.L., 1960. – Effect of histidine on the inhibitory action of 3-amino-1,2,4-triazole. *Weeds*, **8**, 392-396.

- HILTON J.L., 1962. – Riboflavin nullification of inhibitory actions of 3-amino-1,2,4-triazole on seedling growth. *Plant Physiol.*, **37**, 238-244.
- HILTON J.L., KEARNEY P.C. et AMES B.N., 1965. – Mode of action of the herbicide, 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole) : inhibition of an enzyme of histidine biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 544-547.
- HOMÈS M.V., ANSIAUX J.R. et VAN SCHOOR., 1953. – Aquiculture. Laconti, éd., Bruxelles, 44-50.
- JACOBSON A.B. et ROGERS B.J., 1961. – Observations concerning the aminotriazole effect on maize chloroplasts using the electron microscope. *Plant Physiol.*, **36**, suppl. XI.
- JAGENDORF A.T. et AVRON M., 1958. – Cofactors and rates of photosynthetic phosphorylation by Spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **231**, 277-290.
- JOLCHINE G., 1956. – Les acides organiques des feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* Berger. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **38**, 481-493.
- KARRER P. et JUCKER E., 1950. – Carotenoids. Elsevier Publishing Company, Inc.
- KEY J.L., HANSON J.B. et BILLS R.F., 1960. – Effect of 2,4-D application on activity and composition of mitochondria from soybean. *Plant. Physiol.*, **35**, 177-183.
- KLEVSTRAND R. et NORDAL A., 1950. – A spraying reagent for paper chromatograms which is apparently specific for ketoheptoses. *Acta Chem. Skand.*, **4**, 1320.
- KLOPOTOWSKI T. et WIATER A., 1965. – Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate deshydratase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 562-566.
- KROGMANN D.W., JAGENDORF A.T. et AVRON M., 1959. – Uncouplers of Spinach chloroplast photosynthetic phosphorylation. *Plant Physiol.*, **34**, 272-277.
- LEFRANÇOIS G.M., 1960. – Sur les pigments d'une algue bleue : *Oscillatoria subbrevis* Schmidle. Méthode d'extraction, dosage et variations des teneurs en fonction de l'éclairement. *Rev. Cyt. Biol. Vég.*, **22**, 37-45.
- LEFORT M., 1959. – Etude de quelques mutants chlorophylliens induits chez *Lycopersicum esculentum* Mill. *Rev. Cyt. Biol. Vég.*, **20**, 1-159.
- LEPAGE G.A., 1959. – Methods for the analysis of phosphorylated intermediates, in *Manometric Techniques*, W.W. UMBREIT, R.H. BURRIS et J.F. STAUFFER éd. Burgess Pub. Co, Minneapolis, p. 276.
- LINSER H. et KIEMAYER O., 1957. – Zellphysiologische Untersuchungen über die Wirkung von 3-Aminotriazol und 3-(α -Iminoäthyl)-5-methyltetronsäure als spezifische Chlorophyllbildungshemmstoffe bei *Eloдея Canadensis*. *Planta*, **49**, 498-504.
- MACKINNEY G., 1941. – Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **140**, 315-322.
- MARGOLIASH E. et NOVOGRODSKY A., 1958. – A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. *Biochem. J.*, **68**, 468-475.
- MASLOW M., 1964. – Phosphorylation photosynthétique des chloroplastes isolés de *Bryophyllum*. *Physiol. Vég.*, **2**, 209-220.
- MASSINI P., 1958. – Uptake and translocation of 3-amino and 3-hydroxy-1,2,4-triazole in plants. *Acta bot. neerl.*, **7**, 524-530.
- MASSINI P., 1963. – Aminotriazolylalanine : a metabolic product of aminotriazole from plants. *Acta bot. neerl.*, **12**, 64-72.
- McWHORTER C.G., 1963. – Effects of amino-1,2,4-triazole on some chemical constituents of *Zea mays*. *Physiol. Plant.*, **16**, 31-39.
- McWHORTER C.G. et PORTER W.K., 1960. – Studies on the metabolism of plants treated with 3-amino-1,2,4-triazole. *Physiol. Plant.*, **13**, 444-449.
- MENORET Y., 1957. – Antagonisme observé *in vivo* entre l'aminotriazol et les ions Cu^{++} , Ni^{++} , Co^{++} . *Bull. Soc. fr. Physiol. Vég.*, **3**, 131.
- MENORET Y. et TRACEZ J., 1957. – Etude du pouvoir complexant d'un herbicide, le 3-amino-1,2,4-triazol. *C.R. Acad. Sci.*, **244**, 2827-2830.
- MILLER C.S. et HALL W.C., 1957. – Effects of aminotriazole salts and derivatives on cotton defoliation, growth inhibition and respiration. *Weeds*, **5**, 218-226.
- MINTON E.B., PRESTON W.H. et ORGELL W.H., 1958. – Dosage response relationships associated with foliar applications of 3-amino-1,2,4-triazole to Black Valentine Beans. *Plant Physiol.*, **33**, suppl. XLVIII.

- MOYSE A., 1950 a. – Respiration et métabolisme azoté. Hermann et Cie, éd. Paris.
- MUKHERJEE S. et SRIVASTAVA H.C., 1952. – Improved spray reagent for the detection of sugars. *Nature*, **169**, 330.
- MORELAND D.E., GENTNER W.A., HILTON J.L. et HILL K.L., 1959. – Studies on the mechanism of herbicidal action of simazine. *Plant. Physiol.*, **34**, 432-435.
- NELSON N., 1944. – A photometric adaptation to the SOMOGYI method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380.
- NGUYEN-THI S., 1961. – Sur l'incorporation du ^{32}P , à la lumière, par des feuilles de l'*Oryza sativa* L. traité par le 3-amino-1,2,4-triazol. *C.R. Acad. Sci.*, **252**, 1996-1998.
- NICHOLLS P., 1962. – The reaction between aminotriazole and catalase. *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 414-420.
- NIELSEN S.O. et LEHNINGER A.L., 1955. – Phosphorylation coupled to the oxidation of ferrocyclochrome c. *J. biol. Chem.*, **215**, 555-570.
- PASTAC L.A., 1959. – L'aminotriazol et la leucophyllie des plantes vertes. *Bull. Soc. bot. Fr.*, **106**, 205-208.
- PHUNG-NHU-HUNG S., 1964. – Action du 3-amino-1,2,4-triazol sur la phosphorylation photosynthétique des chloroplastes isolés d'*Oryza sativa* L. et comparativement d'autres plantes (*Spinacia oleracea* L. et *Bryophyllum daigremontianum* Berger). *C.R. Acad. Sci.*, **258**, 3541-3543.
- PHUNG-NHU-HUNG S., 1966. – Action du 3-amino-1,2,4-triazol sur la phosphorylation oxydative des mitochondries isolées d'hypocotyles de *Cucumis sativus* L. *C.R. Acad. Sci.*, **262**, 860-863.
- PYFROM H.T., APPLEMAN D. et HEIM W.G., 1957. – Catalase and chlorophyll depression by 3-amino-1,2,4-triazole. *Plant Physiol.*, **32**, 674-676.
- RABINOWITZ J.C. et PRICER W.E. Jr., 1956. – Purine fermentation by *Clostridium cylindrosporum*-V-Formiminoglycine. *J. Biol. Chem.*, **222**, 537-554.
- RACUSEN D., 1958. – The metabolism and translocation of 3-amino-triazole in plants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**, 106-113.
- ROGERS B.J., 1957. – Chlorosis in corn as induced by the herbicide 3-amino-1,2,4-triazole. *Plant Physiol.*, **32**, suppl. VI-VII.
- SCHWEIZER E.E. et ROGERS B.J., 1964. – Effects of amitrole on acid-soluble nucleotides and ribonucleic acid in corn tissue. *Weeds*, **12**, 310-311.
- SEXTON W.A., 1963. – Riboflavin and flavoproteins. in *Chemical constitution and biological activity*. E. & F.N. SPON Ltd, 133-134.
- SHIBUYA I. et HASE E., 1965. – Degradation and formation of sulfolipid occurring concurrently with de-and re-generation of chloroplasts in the cells of *Chlorella protothecoides*. *Plant Cell Physiol.*, **6**, 267-283.
- SHIBUYA I., MARUO B. et BENSON A.A., 1965. – Sulfolipids localization in lamellar lipoprotein. *Plant Physiol.*, **40**, 1251-1256.
- SHIMABUKURO R.H. et LINCK A.J., 1965. – The metabolism of 3-amino-1,2,4-triazole in the fruit of bean, *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.*, **18**, 532-539.
- SIEGEL J.N. et GENTILE A.C., 1966. – Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on histidine metabolism in algae. *Plant Physiol.*, **41**, 670-672.
- SIGNOL M., 1965. – Modifications morphologiques, pigmentaires et cytologiques induites chez divers groupes de végétaux par quelques substances antichlorophylliennes. *Rev. gén. Bot.*, **72**, 417-536.
- SMILLIE R.M., 1962. – Photosynthetic and respiratory activities of growing pea leaves. *Plant Physiol.*, **37**, 716-721.
- SRIVASTAVA M.G., 1959. – Cytological responses of plants to aminotriazole. *Chem. Abst.*, **53**, 21, 20312 h.
- STENLID G. et SADDIK K., 1962. – The effect of some growth regulators and uncoupling agents on oxidative phosphorylation in mitochondria of cucumber hypocotyls. *Physiol. Plant.*, **15**, 369-379.
- SUND K.A., 1956. – Residual activity of 3-amino-1,2,4-triazole in soils. *J. agric. Food Chem.*, **4**, 57-60.

- SUND K.A. et LITTLE H.N., 1960. – Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the synthesis of riboflavin. *Science*, **132**, 622.
- SUND K.A., PUTALA E.C. et LITTLE H.N., 1960. – Reduction of 3-amino-1,2,4-triazole phytotoxicity in tomato plants. *J. agric. Food Chem.*, **8**, 210-212.
- TSCHUDY D.P. et COLLINS A., 1957. – Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on δ -aminolévulinic acid deshydrase activity. *Science*, **126**, 168.
- UMBREIT W.W. et BURRIS R.H., 1959. – Chemical methods. in *Manometric techniques*, W.W. UMBREIT, R.H. BURRIS et J.F. STAUFFER éd. Burgess Pub. C°, Minneapolis, 238.
- WEDDING R.T. et BLACK M.K., 1962. – Response of oxidation and coupled phosphorylation in plant mitochondria to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Physiol.*, **37**, 364-370.
- WEISSBACH A., HORECKER B.L. et HURWITZ J., 1956. – The enzymatic formation of phosphoglyceric acid from ribulose diphosphate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.*, **218**, 795-810.
- WEYTER F.W. et BROQUIST H.P., 1960 – Interference with adenine and histidine metabolism of microorganisms by aminotriazole. *Biochim. Biophys. Acta.*, **40**, 567-569.
- WILLIAMS A.K., COX S.T. et EAGON R.G., 1965. – Conversion of 3-amino-1,2,4-triazole into 3-amino-1,2,4-triazolylalanine and its incorporation into protein of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **18**, 250-254.
- WINTERMANS J.F.G.M., 1960. – Concentrations of phosphatides and glycolipids in leaves and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **44**, 49-54.
- WOLF F.T., 1960. – Influence of aminotriazole on the chloroplast pigments of wheat seedlings. *Nature*, **188**, 164-165.
- WOLF F.T., 1962. – Growth inhibition of *Chlorella* induced by 3-amino-1,2,4-triazole and its reversal by purines. *Nature*, **193**, 901-902.

